



Ana Rita dos Santos Castanheiro

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de um método para a
Determinação de Hidrocarbonetos
Aromáticos Policíclicos em óleo de
girassol por HPLC**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Paula Allen Lopes, Responsável da
Qualidade & Laboratório, Sovena Portugal Consumer
Goods

Co-orientador: Pedro Simões, Prof. Doutor, FCT

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio

Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Vogal: Eng. Paula Cristina Paleta Allen Revez Dias Lopes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2015

Ana Rita dos Santos Castanheiro

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de um método para a Determinação de
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em óleo
de girassol por HPLC**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

**Orientador: Paula Allen Lopes, Responsável da Qualidade &
Laboratório, Sovena Portugal Consumer Goods
Co-orientador: Pedro Simões, Prof. Doutor, FCT**

Júri:

**Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio
Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva
Vogal: Eng. Paula Cristina Paleta Allen Revez Dias Lopes**

Setembro de 2015

Copyright

Validação de um método para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em óleo de girassol por HPLC

Copyright © Ana Rita dos Santos Castanheiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de mestrado contou com a colaboração de várias pessoas sem as quais não teria sido possível a concretização deste trabalho. Como tal, não posso deixar de agradecer:

Ao Professor Doutor Pedro Simões, pela oportunidade em realizar este estágio e pela disponibilidade demonstrada ao longo do desenvolvimento do mesmo.

À Eng^a Maria Lina Dionísio, Diretora Fabril da Sovena, pela possibilidade de realização deste estágio.

À Eng^a Paula Lopes, responsável da Qualidade e Laboratório da Sovena, pela maneira como me acolheu neste trabalho, a sua disponibilidade e os conselhos valiosos para a elaboração da tese.

Aos restantes elementos do Departamento da Qualidade, pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas no decorrer do estágio.

A todas as pessoas que trabalham no Laboratório, pela ajuda na elaboração do trabalho experimental e a colaboração para me ajudar nas diversas situações.

À Doutora Sandra Silva, investigadora do IBET, pela partilha de conhecimentos fundamentais ao longo deste trabalho.

À Professora Doutora Cristina Almeida, da Faculdade de Farmácia, pela disponibilidade e ajuda que contribuíram decisivamente para a elaboração desta tese.

Ao Professor Doutor Marco Silva do Departamento de Química da FCT, pelo esclarecimento de dúvidas essenciais para a realização deste trabalho.

À minha família e amigos, pelo apoio, a amizade e o carinho demonstrado nos momentos mais difíceis e por estarem sempre presentes no decorrer deste percurso académico.

E por fim, mas não menos importante, pelo contrário, ao meu namorado pelo amor, a amizade, a ajuda, a compreensão e a paciência demonstrada nesta etapa da minha vida que foram imprescindíveis e fundamentais para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) constituem uma classe de contaminantes que se encontram presentes nos alimentos e no ambiente, representando nos dias de hoje uma das maiores fontes de exposição humana a este tipo de compostos. Devido às suas características tóxicas, cancerígenas e mutagénicas, vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de remover estes compostos. Deste modo, foi dada especial atenção a oito PAHs carcinogénicos e genotóxicos – benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno [1,2,3-cd]pireno – que individualmente ou em combinação, são atualmente os indicadores possíveis do potencial cancerígeno destes compostos nos alimentos.

Sendo a Sovena uma das grandes empresas produtoras de óleos vegetais, o presente trabalho teve como objetivo estudar a presença dos oito PAHs nos óleos produzidos, tendo-se procedido à implementação, otimização e validação de um método de extração em fase sólida com posterior quantificação dos compostos por HPLC com detetor de fluorescência, utilizando o método do padrão interno.

Os resultados dos ensaios de validação mostraram que o método é linear, com intervalos de linearidade diferentes para cada um dos compostos em estudo. Os limiares analíticos obtidos apresentaram valores satisfatórios para quantificar o B[a]P (LQ=1,2 ppb) e a soma dos quatro PAHs– benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno e benzo[a]pireno (LQ=4 ppb) - sujeitos a limites legais, de 2 ppb e 10 ppb, respetivamente. Atualmente, não existem limites legais para os restantes compostos em estudo.

Para determinar a precisão do método avaliaram-se dois parâmetros importantes - repetibilidade e precisão intermédia, tendo – se obtido um desvio padrão relativo que varia entre 3 e 16,9% para os compostos em estudo, confirmando assim a precisão do método.

A exatidão do método foi avaliada através do cálculo de valores de Z-score, obtidos em ensaios interlaboratoriais, os quais se revelaram satisfatórios. Para além disso, foram realizados ensaios de recuperação, que no entanto não apresentaram os valores expectáveis, sendo assim necessário, no futuro, um estudo mais pormenorizado deste parâmetro.

Palavras – Chave: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos, SPE – HPLC - FLR, Óleo de girassol.

ABSTRACT

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of contaminants which are present in the food and in the environment, representing nowadays one of the major sources of human exposition to this type of compounds. Due to its toxic, carcinogenic and mutagenic properties, several studies have been developed to remove these compounds. Thus, special attention was given to eight carcinogenic and genotoxic PAHs - benz[a]anthracene, chrysene, benz[b]fluoranthene, benz[k]fluoranthene, benz[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene and benz[g,h,i]perylene and indeno [1,2,3-cd]pyrene – which individually or in combination are currently the possible indicators of the carcinogenic potential of these compounds in food.

As Sovena is one of the largest companies producing vegetable oils, the present work aims at studying the presence of the eight PAHs in the produced oils. Therefore, it was carried out the implementation, optimization and validation of an extraction method in solid phase with further quantification of the compounds by HPLC with a fluorescence detector, using the internal standard method.

The validation tests results showed that the method was linear, with different linearity ranges for each compound. Analytical thresholds presented satisfactory values to quantify the B[a]P (LQ= 1,2 ppb) and the sum of the four PAHs - benz [a] anthracene, chrysene, benz [b] fluoranthene and benz [a] pyrene (LQ=4 ppb) - according to legal limits of 2 ppb and 10 ppb, respectively. Currently, there are no legal limits for the remaining compounds under study.

In order to determine the precision of the method there were evaluated two important parameters – repeatability and intermediate precision – in a sample of refined sunflower oil. It was achieved a relative standard deviation between 3 and 16.9% for the compounds under study, thus confirming the precision of the method.

The accuracy of the method was also evaluated through the calculation of Z-score values, obtained in interlaboratory tests, which have proved satisfactory. Moreover, recovery tests were carried out, which however did not show the expected values, thus being necessary in the future, a more detailed study of this parameter.

Key-Words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, SPE- HPLC-FLR, Sunflower Oil.

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1 . Grupo Sovena	1
1.1 . História da Empresa	1
1.2 . Sovena Portugal Consumer Goods	3
2 . Revisão Bibliográfica	5
2.1 . Óleos Vegetais.....	5
2.1.1. Composição Química.....	5
2.1.2. Importância Nutricional	7
2.1.3. Processamento Industrial	7
2.2 . Contaminantes dos óleos vegetais	10
2.2.1. Enquadramento Legal	10
2.2.2. Tipos de Contaminantes	11
2.3 . Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs)	12
2.3.1. Legislação	12
2.3.2. Aspectos Gerais	13
2.3.3. Estrutura Química	15
2.3.4. Características Físico – Químicas	15
2.3.5. Formação dos PAHs.....	18
2.3.6. Toxicidade dos PAHs.....	19
2.3.7. Presença de PAHs em óleos vegetais	21
2.3.7.1. Influência da Refinação	21
2.4 . Método analítico de determinação de PAHs	23
2.5 . Validação de Métodos Analíticos.....	27
3 . Parte Experimental	39
3.1 . Objetivos	39
3.2 . Amostras.....	39
3.3. Materiais e Equipamentos	40
3.3.1. Cuidados e modo de utilização - UPLC.....	40
3.4. Solventes e Reagentes	41
3.5. Padrões	42
3.6. Preparação de Soluções	42
3.7. Condições operacionais	44
3.8. Procedimento Experimental	46
3.9. Análises Efetuadas.....	47

3.9.1. Seletividade	47
3.9.2. Curva de Calibração	47
3.9.3. Linearidade	47
3.9.4. Limiares Analíticos	48
3.9.5. Precisão	48
3.9.6. Exatidão	48
4 . Resultados e Discussão	49
4.1. Seletividade	49
4.2. Curva de Calibração	51
4.3 . Linearidade	57
4.4 . Gama de Trabalho	61
4.5 . Limiares analíticos	61
4.6 . Repetibilidade e Linearidade do Injetor	62
4.7 . Precisão	64
4.7.1. Repetibilidade e Precisão intermédia	64
4.7.2. Reprodutibilidade	66
4.8 . Exatidão	66
4.8.1. Materiais de Referência Certificados (MRC)	66
4.8.2. Ensaio Interlaboratoriais	66
4.8.3. Ensaio de Recuperação	70
5 . Propostas para trabalho futuro	73
6 . Conclusões	75
7 . Bibliografia	77
8 . Anexos	79
Anexo A – Estudos das condições operacionais do método	79
Anexo B – Estudo da Linearidade do padrão interno	84
Anexo C – Estudo da Linearidade dos 8 PAHs	88
Anexo D – Estudo da Linearidade do injetor	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Sovena Group - Áreas de Negócio. Adaptado (1)	2
Figura 1.2 Instalações da Sovena Portugal Consumer Goods (2)	3
Figura 2.1 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela EPA (18) (24)	14
Figura 2.2 Formação de PAHs: Pirossíntese. Adaptado (27)	18
Figura 2.3 Processo de exposição de PAHs na saúde humana. Adaptado (29)	19
Figura 2.4 Etapas de Extração em fase sólida (32)	24
Figura 2.5 Análise Comparativa UPLC vs HPLC (35)	26
Figura 3.1 Equipamento UPLC.....	41
Figura 3.2 Diluições a partir da solução-mãe. Adaptado (44)	43
Figura 4.1 Cromatograma de uma amostra de OGB a 50 ppb (preto) e padrão a 50 ppb - Canal A, B e D	50
Figura 4.2 Cromatograma do padrão interno a 10 ppb – Canal D	51
Figura 4.3 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHs para o canal A	53
Figura 4.4 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHs para o canal B	53
Figura 4.5 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHs para o canal C	54
Figura 4.6 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHs para o Canal D	54
Figura 8.1 Cromatograma 4 PAHs - Gradiente da Norma ISO 15753:2006.....	79
Figura 8.2 Cromatograma 4 PAHs - Gradiente Isocrático Acetonitrilo:Água (75:25).....	79
Figura 8.3 Cromatograma 4 PAHs - Gradiente Isocrático Acetonitrilo:Água (85:15).....	80
Figura 8.4 Cromatograma de 8 PAHs - Gradiente Isocrático Acetonitrilo:Água (85:15).....	80
Figura 8.5 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo:Água (85:15) - Canal A	81
Figura 8.6 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo:Água (85:15) - Canal B	81
Figura 8.7 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo:Água (85:15) - Canal C	81
Figura 8.8 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo:Água (85:15) - Canal D	82
Figura 8.9 Cromatograma 8 PAHs - Variação de gradiente - Canal A	82
Figura 8.10 Cromatograma 8 PAHs - Variação de Gradiente - Canal B.....	82
Figura 8.11 Cromatograma 8 PAHs - Variação de Gradiente - Canal C	83
Figura 8.12 Cromatograma 8 PAHs - Variação de Gradiente - Canal D	83
Figura 8.13 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do padrão interno - Canal A.....	84
Figura 8.14 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do padrão interno - Canal B	85
Figura 8.15 Testes Estatísticos para estudo da linearidade do padrão interno- Canal C.....	86
Figura 8.16 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do padrão interno - Canal D.....	87
Figura 8.17 Testes Estatísticos para o estudo de linearidade do Benzo [a] Antraceno	88
Figura 8.18 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Criseno.....	89
Figura 8.19 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[b]Fluoranteno.....	90
Figura 8.20 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[k]Fluoranteno.....	91
Figura 8.21 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[a]Pireno.....	92

Figura 8.22 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Dibenzo[a,h]Antraceno	93
Figura 8.23 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[g,h,i]Perileno	94
Figura 8.24 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Indeno[1,2,3-cd]Pireno	95
Figura 8.25 Linearidade do injetor - Representação gráfica dos valores da área do pico vs volume de injeção na solução de 8 PAHs a 20 ppb	96
Figura 8.26 Linearidade do injetor - Representação gráfica dos valores da área do pico vs volume de injeção na solução de 8 PAHs a 20 ppb	97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Composição em ácidos gordos do óleo de girassol (7).....	6
Tabela 2.2 Teores máximos de contaminantes permitidos nos óleos e gorduras vegetais (12) (13) (14) (15).....	10
Tabela 2.3 Propriedades Físico - Químicas dos 8 PAHs (26)	17
Tabela 2.4 Classificação dos 8 PAHs segundo a IARC. Adaptado (26)	20
Tabela 2.5 Teor de PAHs (ppb) durante o processo de refinação de óleos vegetais. Adaptado (30) .	22
Tabela 3.1 Cálculos para as respectivas diluições.....	44
Tabela 3.2 Gradiente e fluxo de eluição iniciais	45
Tabela 3.3 Critérios de deteção. Adaptado (24)	45
Tabela 3.4 Gradiente e fluxo de eluição finais.....	46
Tabela 4.1 Parâmetros da primeira curva de calibração do padrão interno para a avaliação da linearidade do método.....	52
Tabela 4.2 Parâmetros da primeira curva de calibração dos 8 PAHs para a avaliação de linearidade do método.....	55
Tabela 4.3 Parâmetros da primeira curva de calibração dos 8 PAHs para a avaliação da linearidade do método (Continuação)	56
Tabela 4.4 Critérios de Aceitação para a definição do intervalo de linearidade.....	57
Tabela 4.5 Intervalo de Linearidade do padrão interno nos quatro canais de fluorescência em estudo	58
Tabela 4.6 Intervalo de Linearidade dos 8 PAHs em estudo	59
Tabela 4.7 Intervalo da Linearidade dos 8 PAHS em estudo (continuação)	60
Tabela 4.8 Limiares analíticos do método com base nos parâmetros da curva de calibração e condições de repetibilidade	61
Tabela 4.9 Valores do sinal (área relativa) para as 10 injeções das soluções-padrão referentes ao primeiro ponto da curva de calibração para avaliação da repetibilidade do injetor	63
Tabela 4.10 Concentração de cada PAH para a amostra de óleo de girassol refinado analisado em condições de repetibilidade (dia1) e precisão intermédia(dias 2 e 3)	64
Tabela 4.11 Limites de repetibilidade segundo ensaios de repetibilidade	65
Tabela 4.12 Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais para a amostra de óleo de girassol refinado (ppb)	68
Tabela 4.13 Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais para a amostra de óleo de girassol bruto (ppb)	68
Tabela 4.14 Resultados obtidos para o óleo de girassol fornecido pelo BIPEA - Ensaio de aptidão para os 4 PAHs(ppb)	69
Tabela 4.15 Resultados obtidos, pelo Laboratório da Sovena, na análise da amostra do óleo de girassol refinado, englobado no ensaio interlaboratorial e respectivos valores do erro normalizado (ppb)	69

Tabela 4.16 Resultados obtidos, pelo Laboratório da Sovena, na análise da amostra de óleo de girassol bruto, englobado no ensaio interlaboratorial e respectivos valores do erro normalizado(ppb)	70
Tabela 4.17 Resultados obtidos, pelo Laboratório da Sovena, na análise da amostra de óleo de girassol BIPEA, englobado no ensaio interlaboratorial e respectivos valores do erro normalizado (ppb)	70
Tabela 4.18 Taxas de Recuperação (%) - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para o óleo de girassol refinado	72
Tabela 4.19 Taxas de Recuperação (%) - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para o óleo de girassol bruto	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AESA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

ALA – Ácido alfa-linoleico

B[a]A – Benzo [a] Antraceno

B[b]F – Benzo [b] Fluoranteno

B[k]F – Benzo [k] Fluoranteno

B[a]P – Benzo [a] Pireno

B[g,h,i]P – Benzo (g,h,i) Perileno

B[b]C – Benzo [b] Criseno

CCAH – Comité Científico da Alimentação Humana

CUF – Companhia União Fabril

Dib[a,h]A – Dibenzo [a,h] Antraceno

ELL – Extração Líquido-Líquido

EPA – Environmental Protection Agency

EPTARI – Estação de Pré-tratamento de Águas Residuais Industriais

FLR – Fluorescência (*Flourescence*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performace Liquid Cromatography*)

IARC - Agência Internacional de Pesquisas sobre o Cancro (*Internacional Agency for Research on Cancer*)

IUPAC – União Internacional da Química Pura e Aplicada (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low Density Lipoprotein*)

MENA – Middle East &North Africa

OGB – Óleo de Girassol Bruto

PAHs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*)

Painel CONTAM – Painei Cientifico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar

PCBs – Bifenilos Policlorados (*Polychlorinated Biphenyls*)

PI – Padrão Interno

MM – Massa Molecular

PDA – Detetor de Fotodíodo (*Photodiode Array*)

Sovena – Sovena Portugal Consumer Goods

SPE - Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

UPLC - Cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra Performace Liquid Cromatography*)

λ – Comprimento de Onda

1 . Grupo Sovena

1.1. História da Empresa

A história da empresa tem início nos finais do séc. XIX criado por Alfredo da Silva, cresce o primeiro grupo industrial, comercial e financeiro de Portugal, a CUF, representada pela junção de duas empresas químicas, a União Fabril e a Companhia da Aliança Fabril.

No início do séc. XX, foi considerado o maior grupo português, com uma unidade industrial no Barreiro, com mais de 100 empresas, 110.000 colaboradores e mais de 1000 produtos diferentes nas áreas dos tubos, têxteis, óleos alimentares, entre outros.

No entanto, após o 25 de Abril de 1974, deu-se o fim da CUF devido à instabilidade social e política causada pelo fim da ditadura em Portugal (1).

Nos finais do séc. XX, com o regresso da estabilidade social e política dá-se a reconstrução do grupo, pelos portugueses Jorge de Mello e José Manuel de Mello.

Foi então que em 1982, Jorge de Mello reentra no mercado português com a compra da Sociedade Alco e Algodoeira Comercial e Industrial, cujo o negócio abrangia a extração, a refinação e embalamento de óleos alimentares.

Em 1985, adquiriu também a fábrica Torrejana de Azeites, em Torres Novas (1).

Já na década de 90, com o objetivo de reforçar a liderança do grupo no mercado de óleos e azeites, seguem-se mais aquisições, com a Lusol, responsável pela extração e refinação de óleos e produção de sabões; a Tagol, encarregue da extração e refinação de oleaginosas e soja e, só mais tarde a Sovena (criada em 1956) através de uma parceria entre a CUF, a Macedo e Coelho e a Sociedade Nacional de Sabões, para a produção e comercialização de óleos vegetais e sabões (1).

No início do séc. XXI deu-se a reorganização industrial do grupo, com as atividades concentradas na Tagol e na Sovena, assim como o começo de novas aquisições devido as necessidades crescentes de responder a mercados internacionais (1).

Em 2002, a aquisição da empresa Agribética em Sevilha e posterior integração na Sovena Ibérica de Aceites, com as atividades de refinação e embalamento de óleos vegetais, na sua grande maioria azeite, permitiram ao grupo tornar-se o maior operador da Península Ibérica.

Em 2004, o grupo adquire os ativos do, Simão & Companhia, de modo a relançar a marca Andorinha no mercado brasileiro (1).

Já em 2005, a empresa adquire 80% do capital *East Coast Olive Oil*, o maior importador e embalador de azeite nos E.U.A. No mesmo ano, o grupo constitui a Tagol Ibérica de Aceites em Espanha para facilitar o acesso ao mercado de semente de girassol nesse país (1).

Após alcançados os três continentes em três anos, em 2006 o grupo cria mais uma empresa em Marrocos, a Soprolives, com apoio do grupo SOMED, que através de exploração de olival, tem como objetivo produzir e comercializar azeite para fornecer diversos mercados internacionais.

Ainda no mesmo ano, a Tagol, em parceria com a Bunge, constitui a BioColza, cujo principal objetivo consiste na extração de semente de colza e comercialização de produtos daí consequentes. O grupo adquire também, em Espanha, 80% do capital da Exoliva, empresa dedicada exclusivamente à preparação e embalamento de azeitonas, destinadas principalmente à exportação (mercado Russo, Ucraniano e do Médio Oriente) (1).

Em 2007, foi criada na Tunísia a Sovena MENA, através de uma empresa local, para fornecer o mercado tunisino e países limítrofes (1).

A entrada do grupo na agricultura ocorre em 2006 com a Soprolives em Marrocos, mas é em 2007, em associação com a Atitlan, que se cria o projeto Elaia, que visa a plantação de cerca de 10.000 hectares de olival.

Ainda em 2007, uma parceria com a Diester Internacional, leva à criação da Agrodiesel instalada junto à fábrica da Tagol (1).

No ano 2008 começa a unificação do grupo Alco com as respetivas empresas, passando a designar – se Sovena Group, com 4 unidades de negócios diferentes (Figura 1.1).

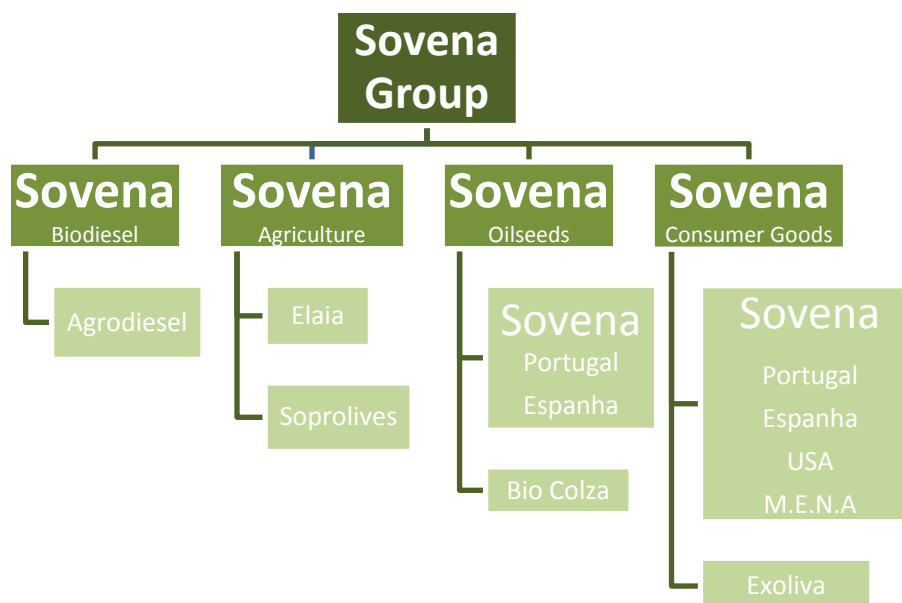


Figura 1.1 Sovena Group - Áreas de Negócio. Adaptado (1)

Em 2010, a Sovena deu início à construção de um lagar e assinou um contrato que fez aumentar a exploração agrícola do grupo a 57 herdades portuguesas e um total de 10 mil hectares de olival. O grupo Sovena consegue assim assegurar um maior domínio em toda a cadeia de valor do olival, na vertente da produção, transformação e embalamento.

A campanha de azeite de 2013/2014 contou já com um novo lagar, o Lagar do Painho, concebido para laborar a azeitona produzida pela Elaia. Deste modo, o grupo é considerado o 2º maior operador mundial de azeites tendo obtido, em 2013, mais de 200 000 toneladas de azeite (1).

Hoje em dia, o mercado internacional representa cerca de 80% do negócio da Sovena, com exportações para mais de 70 países (1).

1.2. Sovena Portugal Consumer Goods

As instalações da empresa situam-se no Barreiro, sendo hoje em dia em Portugal a maior fábrica de refinação e embalamento de óleos e azeite. Nesta área de negócio, é considerada uma das unidades industriais com melhor desenvolvimento tecnológico da Europa, razões que levaram a empresa ao primeiro lugar no mercado português (Figura 1.2).



Figura 1.2 Instalações da Sovena Portugal Consumer Goods (2)

A empresa produz grandes marcas portuguesas como Fula, Oliveira da Serra, Vegê e Andorinha. A fábrica detém uma capacidade diária de refinação de 350 toneladas de girassol ou 320 toneladas de soja. São embalados diariamente, nos mais diversos formatos e tamanhos, 90.000 L de azeite e 650.000 L de óleo (2).

2 . Revisão Bibliográfica

2.1. Óleos Vegetais

Os óleos vegetais são uma importante fonte de energia na dieta alimentar de muitos consumidores. Fazem parte de um grupo vasto de compostos designados por lípidos, cuja característica comum é o facto de serem insolúveis em água e geralmente solúveis em solventes orgânicos. A distinção entre óleo vegetal ou gordura vegetal faz-se pelo facto de serem líquidos ou sólidos à temperatura de 20°C, respetivamente (3).

Segundo o Decreto de Lei nº106/2005, as gorduras e os óleos vegetais devem ser provenientes de diversos tipos de frutos ou sementes oleaginosas em condições de facultar um produto bromatologicamente aceitável, em perfeito estado de conservação e isento de substâncias ou matérias estranhas à sua normal composição bem como de microrganismos patogénicos ou de substâncias destes derivados em níveis suscetíveis de prejudicar a saúde humana (3).

O óleo de girassol, obtido através de refinação do óleo extraído da semente *Helianthus annus L.*, e o óleo de soja, obtido através da refinação do óleo extraído da semente *Glycine Max L.Merril*, são dois dos óleos vegetais destinados à alimentação humana (3).

A mistura destes dois óleos permite obter um produto final com características particulares, resultante das propriedades de cada um dos óleos.

Para além deste facto, são muito importantes nas propriedades funcionais de muitos alimentos, conferindo-lhes sabor e palatabilidade. Muitas das aplicações técnicas dos óleos vegetais nos alimentos dependem das suas propriedades físicas e químicas (4).

2.1.1. Composição Química

Quimicamente um óleo é constituído por substâncias que estão reunidas em duas classes (5):

- Glicéridos: resultantes da esterificação de uma molécula de glicerol com até três moléculas de ácidos gordos, formando predominantemente 97 a 99% de triglicéridos (mas também mono e diglicerídeos resultantes da hidrólise) e ácidos gordos livres;
- Não – glicéridos: como os fosfatos, esteróis, ceras, hidrocarbonetos insolúveis, carotenóides, clorofila, tocoferóis (vitamina E), latonas e metilcetonas, em pequenas quantidades (1-3%).

Os ácidos gordos que formam os triglicéridos dos óleos são ácidos monocarboxílicos de cadeia longa e com o número de par de átomos de carbono (C4 a C24) dispostos em cadeia lineares. Podem ser

saturados quando possuem apenas ligações simples entre os átomos de carbono ou insaturados quando possuem um ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono (6).

Na tabela 2.1 está discriminada a composição em ácidos gordos do óleo vegetal em estudo.

Tabela 2.1 Composição em ácidos gordos do óleo de girassol (7)

Ácidos Gordos		Óleo de girassol (%)
Ácido capróico	C6:0	ND
Ácido caprílico	C8:0	ND
Ácido cáprico	C10:0	ND
Ácido láurico	C12:0	ND - 0.1
Ácido Mirístico	C14:0	ND - 0.2
Ácido Palmítico	C16:0	5.0 - 7.6
Ácido Palmitoleico	C16:1	ND - 0.3
Ácido n-heptadecanoico	C17:0	ND - 0.2
Ácido 9 -heptadecanoico	C17:1	ND - 0.1
Ácido esteárico	C18:0	2.7 - 6.5
Ácido oleico	C18:1	14.0 - 39.4
Ácido linoleico	C18:2	48.3 - 74.0
Ácido linolénico	C18:3	ND - 0.3
Ácido araquídico	C20:0	0.1 - 0.5
Ácido eicosenóico	C20:1	ND - 0.3
Ácido eicosadienóico	C20:2	ND
Ácido beénico	C22:0	0.3 - 1.5
Ácido erúcico	C22:1	ND - 0.3
Ácido docosadienóico	C22:2	ND - 0.3
Ácido linhocérico	C24:0	ND - 0.5
Ácido tetracosenoico	C24:1	ND

ND – não detetado (valores <0,05%)

2.1.2. Importância Nutricional

Os ácidos gordos executam diferentes funções ao nível da nutrição humana, podendo apresentar efeitos benéficos ou prejudiciais para a saúde, consoante o tipo de ácido gordo. Os ácidos gordos insaturados, como o ácido linoleico e o oleico, são os ácidos gordos que o organismo melhor tolera, uma vez que o seu consumo está associado a uma diminuição da fração LDL do colesterol sanguíneo e com a manutenção da integridade celular. Os ácidos gordos saturados como o láurico, o mirístico e o palmítico, estão presentes geralmente em pequenas quantidades e contribuem para elevar o colesterol sanguíneo e os níveis de LDL (8).

Os óleos vegetais têm ainda outros benefícios escondidos que é importante salientar, nomeadamente a sua composição em ácidos gordos essenciais – ómega 3 e ómega 6 – os quais o organismo não consegue produzir e por isso necessita obter através da alimentação. Estes ácidos contribuem para bom funcionamento do metabolismo, que tem um papel fundamental no desempenho das hormonas e das substâncias que controlam a fluidez do sangue. De igual modo, contribuem para o crescimento e desenvolvimento cerebral, especialmente nas crianças.

Os ómega-3 do tipo ALA encontram-se no óleo de soja e são fundamentais ao bom desempenho dos neurónios. Relativamente aos ómegas - 6, mais conhecidos por ácido linoleico, é possível encontrá-los nos óleos vegetais como milho, soja e girassol (9).

2.1.3. Processamento Industrial

Após a receção das sementes oleaginosas e respetivo armazenamento em silos, efetua-se a pré-limpeza com auxílio de separadores magnéticos para eliminação de materiais ferrosos. Seguidamente procede-se à pesagem e limpeza, com posterior moagem. Posteriormente, é feito um acondicionamento das sementes através de vapor ocorrendo a coalescência de bolhas de óleo e agregação proteica (10).

O óleo propriamente dito é obtido por extração, em primeiro lugar, efectua-se uma prensagem mecânica, obtendo-se o óleo de primeira pressão, e uma pasta que é submetida a extração por solvente. Assim sendo, obtém-se um óleo de segunda pressão que sofre uma separação do solvente por destilação e consequente degomagem, secagem e arrefecimento do óleo, ao qual se adiciona ao primeiro óleo bruto (10).

O bagaço obtido da segunda pressão, passa por uma fase de dessolventização, com posterior granulação, arrefecimento e secagem, podendo destinar-se à alimentação animal.

No caso do óleo de girassol o rendimento obtido da extração por prensagem e por solvente é, em média, 65% e 35%, respetivamente. Contrariamente, no óleo de soja a extração é apenas efetuada com solvente obtendo-se apenas 25% de óleo (10).

Na extração com solventes utiliza-se o hexano comercial, ou seja, *n*-hexano com uma percentagem de 50-90% em volume (10).

Após a obtenção do óleo bruto, que contém impurezas (como ácidos gordos livres, fosfolípidos, ceras, pigmentos, proteínas, glícidos, pesticidas e micotoxinas), é feita a sua remoção por refinação de modo a garantir a estabilidade, o sabor, a aparência e o odor do produto final.

Deste modo, o processo de refinação do óleo de girassol é constituído pelas seguintes fases:

1) Neutralização

O óleo bruto é enviado para a unidade de neutralização, sendo primeiramente adicionado ao óleo uma solução aquosa de ácido fosfórico para ajudar na hidratação dos fosfatídeos não hidratáveis. Após esta fase, estes tornam-se hidrófilos permitindo assim a solubilidade do fósforo em água.

Logo após a reação química, as massas de neutralização são separadas do óleo neutro por centrifugação à temperatura de 80-90°C. As respetivas massas, que constituem um subproduto de valor acrescentado, são depositadas num tanque e vendidas a uma empresa externa (11).

2) Winterização

Esta etapa tem como objetivo remover as ceras e estearinas contidas no óleo de girassol, que a temperaturas baixas podem solidificar, dando turbidez ao óleo.

A operação realiza-se por arrefecimento do óleo até cerca de 6 a 10°C, num período de 8 horas em maturadores. Assim sendo, ao óleo neutro obtido é adicionado uma solução de soda cáustica, que permite a formação de cristais de ceras que serão posteriormente separadas do óleo na fase aquosa/sabões por centrifugação. Consoante a quantidade de sabões presentes é adicionado ácido sulfúrico (98%) e ácido clorídrico (33%) com objetivo de quebrar a emulsão gordura e água.

As águas são posteriormente neutralizadas com hidróxido de sódio para corrigir o pH para valores de 5,5 -7,5, sendo encaminhadas para EPTARI. Em relação as ceras, estas são encaminhadas para um tanque de expedição para posterior venda (11).

3) Lavagem

O objetivo nesta fase é remover os restos de sabão ainda presentes no óleo. Deste modo, ao óleo neutro winterizado é adicionado água quente (10%), sendo a mistura aquecida a 80-90°C de modo a solubilizar os sais de sódio na água. Posteriormente as fases são separadas novamente por centrifugação (11).

4) Branqueamento

Após obtido o óleo lavado, este segue para a fase de branqueamento aonde são adicionadas as terras de branqueamento e o carvão ativado, para remoção de pigmentos (clorofila, carotenos, e peróxidos), resíduos de sabões, fosfatídeos, entre outros. Para além disto, o óleo sofre uma descoloração a determinadas condições de temperatura e pressão de modo a garantir a remoção de humidade e ar.

Por outro lado, a adição de carvão ativado permite a adsorção dos PAHs pesados, ficando desta forma retido nas terras e eliminado do óleo.

Nesta etapa, a adição de ácido cítrico permite a formação de complexos com metais pesados ajudando à sua remoção.

Posteriormente, a remoção das terras é realizada por filtração, ficando uma percentagem residual de óleo de 20-30% no bolo (11).

5) Desodorização

O óleo branqueado segue para a etapa de desodorização para a destilação/volatilização dos compostos através de vácuo, a pressões a rondar os 2 Torr e a temperaturas de 230°C. Ao processo é adicionado vapor direto, para garantir que todas as partículas estão a temperatura e a pressão de desodorização, assim como se obtém uma maior área específica e naturalmente maior eliminação de compostos voláteis.

Nesta etapa, há ainda eliminação dos PAHs de baixo peso molecular (compostos por 2 a 3 anéis aromáticos).

Relativamente aos destilados obtidos, estes são armazenados em tanques de expedição para a respetiva venda (11).

6) Polimento final

Para que esta operação possa ocorrer, o óleo de desodorização é encaminhado para uma zona de refrigeração, sendo arrefecido até 12-15°C por um permutador com água glicolada, seguindo posteriormente para maturadores durante 12 a 17 horas.

Por último, é adicionado ao óleo coadjuvantes de filtração e celulose de forma a auxiliar a sua filtração (filtros de placas). Os bolos obtidos são recolhidos por uma empresa externa para junção em farinhas para animais (11).

Relativamente ao processo de refinação do óleo de soja há que ter em conta que a etapa de winterização não ocorre, uma vez que o mesmo não contém ceras. Deste modo, esta etapa é substituída por duas lavagens com água, seguidas de uma centrifugação cada, respetivamente. As restantes etapas processam-se de igual modo como apresentado acima.

2.2. Contaminantes dos óleos vegetais

2.2.1. Enquadramento Legal

A crescente procura de alimentos seguros têm levado as entidades europeias a criar regulamentos cada vez mais restritos para o controlo de contaminantes nos alimentos.

Em geral, tal contaminação advém de diversas fontes e processos de produção que apresentam um efeito negativo na qualidade dos alimentos podendo assim por em risco a saúde pública.

Deste modo, com o intuito de proteger a saúde humana é necessário manter os contaminantes a níveis aceitáveis do ponto de vista toxicológico (12).

Assim sendo, as normas em vigor relativas aos teores máximos de certos contaminantes presentes nos alimentos encontram-se enunciados no regulamento (CE) nº1881/2006 e posteriores alterações no:

- Regulamento (UE) nº1259/2011 da Comissão de 2 de Dezembro de 2011 referente aos teores máximos para as dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas nos géneros alimentícios;
- Regulamento (UE) nº835/2011 da Comissão de 19 de Agosto de 2011 referente aos teores máximos de PAHs presentes nos géneros alimentícios;
- Regulamento (CE) nº1151/2009 da Comissão de 27 de Novembro de 2009 que impõe condições especiais à importação de óleo de girassol originário ou expedido da Ucrânia devido a riscos de contaminação com óleo mineral e que revoga a Decisão 2008/433/CE.

Sendo o elemento em estudo o óleo de girassol, são citados, na tabela 2.2, os limites legais permitidos para cada contaminante nos óleos e gorduras vegetais.

Tabela 2.2 Teores máximos de contaminantes permitidos nos óleos e gorduras vegetais (12) (13) (14) (15)

Contaminantes	Teores Máximos		
Dioxinas e PCBs	Σ Dioxinas	Σ Dioxinas e PCB sob a forma de dioxina	Σ PCB (28,52,101,138,153,180)
	0,75 pg/g de gordura	1,5 pg/g de gordura	40 ng/g de gordura
Chumbo	0,1 mg/kg		
PAHs	Benzo[a]Pireno	Σ 4 PAHs	
	2 µg/kg	10 µg/kg	
Óleo Mineral	< 50 mg/kg		

2.2.2. Tipos de Contaminantes

Dioxinas e PCBs

As dioxinas e os PCBs sob a forma de dioxinas são compostos químicos tóxicos que decorrem de certos processos naturais ou industriais.

Na sua constituição, as dioxinas incluem um conjunto de 75 dibenzo-p-dioxinas policlorados (PCDD) e 135 compostos de dibenzofuranos policlorados (PCDF), sendo 17 de preocupação a nível toxicológico. São subprodutos de vários processos químicos, formando – se em praticamente todos os processos de combustão (12).

Relativamente aos PCBs, estes possuem um grupo de 209 compostos, entre os quais 12 apresentam características idênticas às dioxinas, sendo por isso designados por PCB sob a forma de dioxina (12).

A principal via de exposição a estes compostos é através da ingestão de alimentos, apresentando efeitos nefastos para a saúde, tais como cancros, problemas imunitários e do sistema nervoso, entre outros (16).

Chumbo

O chumbo encontra-se largamente disperso na natureza, na sequência de processos antropogénicos como atividades industriais na combustão do carvão ou incineração de resíduos que constituem fontes emissoras de metais pesados.

As vias de exposição ao chumbo são a via cutânea, oral ou por inalação, sendo no entanto a ingestão de alimentos a principal via de exposição humana.

A presença de chumbo pode constituir um grave risco para a saúde humana, incitando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e redução do desempenho intelectual e cognitivo nas crianças (16).

Óleo Mineral

O óleo mineral é um subproduto de baixo custo obtido da destilação do petróleo durante a produção da gasolina. É um óleo incolor, transparente, e praticamente inerte, composto essencialmente por alcanos (entre 15 e 40 carbonos) e parafinas cíclicas.

A presença de óleo mineral nos alimentos suscitou uma maior preocupação desde 2008, aquando milhares de toneladas de óleo de girassol proveniente da Ucrânia, apresentava valores elevados na sua constituição.

Assim sendo, foi criado a nível europeu um sistema de controlo adequado, para garantir que todo o óleo de girassol a ser exportado pela Ucrânia se apresentava isento de óleo mineral, tornando o óleo de girassol próprio para consumo (17).

O óleo mineral tem sido detetado em diferentes géneros alimentícios, como óleos alimentares, ovos, legumes, gordura de cacau, entre outros. As principais fontes de contaminação são provenientes de materiais de embalagem, lubrificantes das linhas de produção e contaminação ambiental.

2.3. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs)

2.3.1. Legislação

Tendo em conta o Regulamento (CEE) nº315/93 do Conselho, de 8 de Fevereiro de 1993, que estabelece os procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios, a comissão das comunidades europeias adotou mais recentemente o Regulamento (CE) nº1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, particularmente o teor máximo de B[a]P (13).

O B[a]P pertence ao grupo dos PAHs e, com base num parecer do CCAH, é utilizado como marcador relativamente à ocorrência e ao efeito de PAHs cancerígenos nos géneros alimentícios. No entanto, em Dezembro de 2002, o CCAH recomendou que são necessárias mais análises sobre as proporções relativas de PAHs nos alimentos, para uma decisão sobre a manutenção do B[a]P como marcador (13).

Na sequência da recomendação relativa a investigação suplementar dos níveis de PAHs em certos alimentos (2005/108/CE), dezoito Estados Membros apresentaram cerca de 10000 resultados para os níveis de PAHs em diferentes produtos alimentares (13).

Assim sendo, a Comissão solicitou à AESA a reavaliação dos novos dados relativamente à ocorrência de PAHs cancerígenos nos alimentos, sendo que uma avaliação destes dados realizados em Junho de 2007 e atualizado em Junho de 2008 demonstrou que o B[a]P pode ser detetado em 50% das amostras. No entanto, em cerca de 30% das amostras, foram detetados outros PAHs carcinogénicos e genotóxicos, apesar de testes negativos para o B[a]P. Dos PAHs individuais, o criseno foi o mais vulgarmente encontrado em amostras negativas para o B[a]P, atingindo 242 µg / kg (18).

Posto isto, o painel CONTAM da AESA conclui que o B[a]P não é um marcador adequado para ocorrência de PAHs nos alimentos e que um sistema de 4 PAHs¹ ou de 8 PAHs² seriam os indicadores mais adequados dos PAHs nos alimentos (18).

Deste modo, foi dada especial atenção a oito PAHs carcinogénicos e genotóxicos medidos nas misturas de alcatrão de hulha utilizado nos estudos de carcinogenicidade, que individualmente ou em combinação, são atualmente os possíveis indicadores do potencial cancerígeno de PAHs nos alimentos (18).

Com base nos dados atualmente disponíveis relativos à ocorrência de toxicidade, o Painel CONTAM concluiu que os 8 PAHs não fornecem valor acrescentado em comparação com 4 PAHs (18).

Foram assim introduzidos novos teores máximos para a soma dos 4 PAHs de 10 ppb nos óleos e gorduras, sustentando, no entanto um teor máximo distinto para o B[a]P de 2 ppb, de modo a garantir a comparabilidade com dados anteriores e futuros (13).

2.3.2. Aspetos Gerais

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) constituem uma classe de contaminantes que se encontram presentes nos alimentos e no ambiente. São formados durante a combustão incompleta de material orgânico a elevadas temperaturas, através de processos antropogénicos ou naturais.

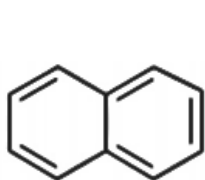
As fontes antropogénicas mais importantes incluem queima de carvão, fumo de cigarro, emissões automóveis, incineração, aquecimento doméstico e processos industriais. Enquanto que, as principais fontes naturais compreendem erupções vulcânicas, fogos florestais e processos geotérmicos com emissão de PAHs bastante reduzida (19) (20).

O carácter ubíquo dos PAHs confere-lhes vasta mobilidade no meio ambiente, estando dispersos no ar, na água e no solo. Centenas de PAHs foram identificados como compostos precursores de ações mutagénicas e carcinogénicas e representam elevado risco para a saúde humana. No entanto de acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA) são considerados como poluentes orgânicos prioritários, 16 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Figura 2.1) (21).

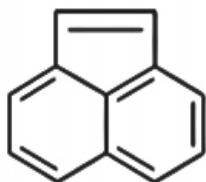
¹ 4 PAHs – benzo[a] antraceno, criseno, benzo [b] fluoranteno e benzo [a] pireno.

² 8 PAHs – benzo [a] antraceno, criseno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo [g,h,i] perileno, dibenzo [a,h] antraceno e o indeno [1,2,3-cd] pireno.

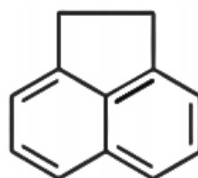
10 PAH's Leves



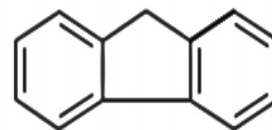
Naftaleno



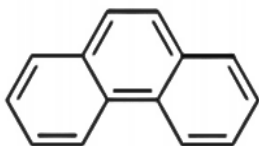
Acenaftileno



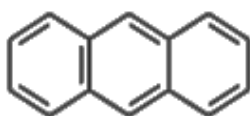
Acenafteno



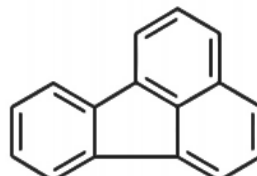
Fluoreno



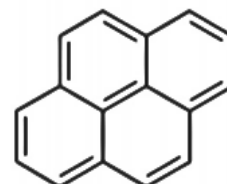
Fenantreno



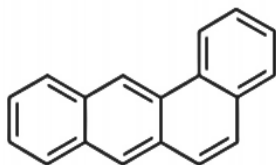
Antraceno



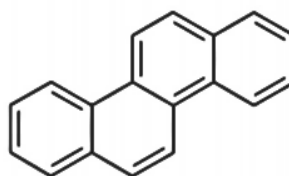
Fluoranteno



Pireno

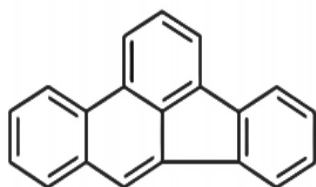


Benzo [a] antraceno

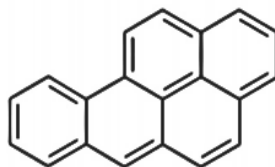


Criseno

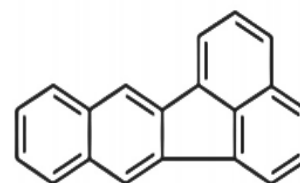
6 PAH's Pesados



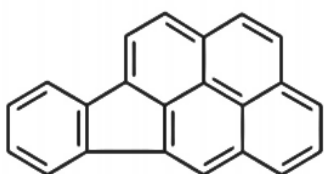
Benzo [b] fluoranteno



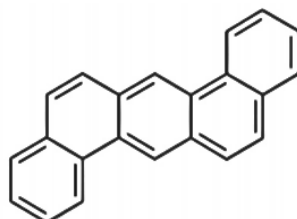
Benzo [a] pireno



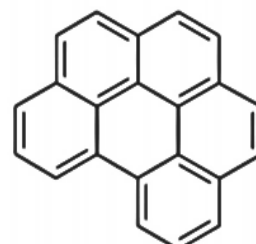
Benzo [k] fluoranteno



Indeno [1,2,3-cd]
pireno



Dibenz [a,h] antraceno



Benzo [ghi] perileno

Figura 2.1 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela EPA (18) (24)

2.3.3. Estrutura Química

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são uma classe de compostos orgânicos, que contém unicamente hidrogénio e carbono, unidos por dois ou mais anéis aromáticos. A fusão destes compostos pode ser linear, com anéis em linha (antraceno); angular, com anéis em escada (fenantreno) ou agrupada em que pelo menos um dos anéis está rodeado em 3 lados (pireno) (22).

Integram um grupo mais vasto, os compostos aromáticos policíclicos (PACs), que incluem PAHs contendo grupos hidroxilo (-OH), amino (-NH), nitro (-NO₂), ciano (-CN), carboxilo (-COOH) ou cloro (-Cl) ligados aos anéis de estrutura básica. Os átomos de carbono dos anéis benzénicos podem ainda ser substituídos por azoto, enxofre e oxigénio (22).

Os PAHs podem considerar-se em dois grandes grupos consoante a natureza dos seus anéis, respetivamente alternantes e não alternantes. No primeiro caso, os PAHs derivam do benzeno por fusão de anéis benzénicos. Relativamente aos não alternantes, para além dos anéis aromáticos podem conter anéis com diferentes átomos de carbono (23).

Podem ainda dividir-se em PAHs leves, contendo dois a quatro anéis aromáticos, nomeadamente naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo (a) antraceno e criseno que apresentam elevada toxicidade, no entanto não são carcinogénicos; ou PAHs pesados contendo cinco a seis anéis aromáticos, particularmente benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno e indeno [1,2,3-c,d] pireno (24).

2.3.4. Características Físico – Químicas

O comportamento, o transporte e o destino dos PAHs no meio ambiente dependem essencialmente das suas características físico-químicas e bioquímicas, que em grande parte são determinadas pela estrutura química. Deste modo, parâmetros como o ponto de ebulição, ponto de fusão, pressão de vapor e solubilidade em água, variam principalmente com a massa molecular (Tabela 2.3).

À temperatura ambiente, os PAHs são sólidos e apresentam habitualmente, altas temperaturas de ebulição e de fusão, assim como, baixas pressões de vapor e solubilidade em água. Os valores relativos as duas últimas propriedades tendem a diminuir com o aumento da massa molecular, contrariamente aos pontos de ebulição e fusão que tendem aumentar (25).

Relativamente a volatilidade, alguns PAHs são semi – voláteis, sendo no entanto muito deles conduzidos a grandes distâncias e adsorvidos em partículas suspensas no ar. Os PAHs com dois a

três anéis aromáticos encontram-se totalmente na fase de vapor, sendo os de cinco ou mais anéis aromáticos encontrados especificamente em partículas presentes no ar (18).

Devido ao seu carácter lipofílico, os PAHs tendem a acumular em tecidos lipídicos de organismos vivos, sendo que nas plantas estes compostos fixam-se mais facilmente na superfície, nomeadamente nas folhas.

A hidrofobicidade é uma peculiaridade destes compostos, que são na sua maioria solúveis em solventes orgânicos e relativamente insolúveis em água (18).

Quimicamente, os PAHs são estáveis no entanto podem ser foto-oxidados e degradados em compostos mais simples, quando sujeitos a elevadas temperaturas (50°C) e à presença da luz, especialmente à luz ultravioleta (19).

Em condições aeróbicas os PAHs com quatro anéis aromáticos são biodegradáveis, sendo que velocidade de degradação diminui com o aumento do número de anéis. Contrariamente, sob condições anaeróbicas a velocidade de degradação de todos os compostos é lenta (20).

Tabela 2.3 Propriedades Físico - Químicas dos 8 PAHs (26)

Substância	Nº CAS	MM (g/mol)	Ponto de ebulição (°C)	Ponto de fusão (°C)	Pressão de Vapor (Pa a 25°C)	Log K (o/a)	Solubilidade em água (mg/l, 25 °C)	Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹ a 25°C)
Benzo[a]antraceno	56-55-3	228,3	400	160,7	$2,8 \cdot 10^{-5}$	5,91	0,0090	1,22
Criseno	218-01-9	228,3	448	253,8	$8,4 \cdot 10^{-4}$	5,86	0,0018	0,53
Benzo[b]fluoranteno	205-99-2	252,3	481	168,3	-	5,78	0,0015	0,05
Benzo[k]fluoranteno	207-08-9	252,3	480	215,7	$1,3 \cdot 10^{-7}$	6,11	0,0008	0,04
Benzo[a]pireno	50-32-8	252,3	496	178,1	$7,3 \cdot 10^{-7}$	6,35	0,0038	0,03
Indeno[1,2,3-cd]pireno	193-39-5	276,3	530	163,6	$1,3 \cdot 10^{-8}$ (20°C)	-	0,0002	0,03 (20 °C)
Benzo[g,h,i]perileno	191-24-2	276,3	550	278,3	$1,4 \cdot 10^{-8}$	6,9	0,0003	0,03 (20 °C)
Dibenzo[a,h]antraceno	53-70-3	278,4	524	266,6	$1,3 \cdot 10^{-8}$ (20°C)	6,75	0,0005	-

2.3.5. Formação dos PAHs

Os PAHs podem ser sintetizados a partir de hidrocarbonetos saturados, sob condições de deficiência de oxigênio, assim como de pressão e calor. A pirólise e pirossíntese são dois mecanismos distintos de formação destes compostos (27).

Quando a temperatura excede os 500°C, compostos orgânicos de elevada massa molecular são quebrados em moléculas menores, com dois ou três anéis aromáticos e radicais livres (pirólise). Os PAHs e os radicais livres gerados podem recombinar –se para produzir moléculas mais estáveis, com 6 anéis aromáticos, que são resistentes à degradação térmica (pirossíntese) (27).

No entanto a formação de PAHs também pode ocorrer a baixas temperaturas, contudo requer mais tempo e pode originar grandes quantidades de hidrocarbonetos alquilados (28).

A figura 2.2 esquematiza a formação da generalidade dos PAHs sintetizados a partir de hidrocarbonetos saturados.

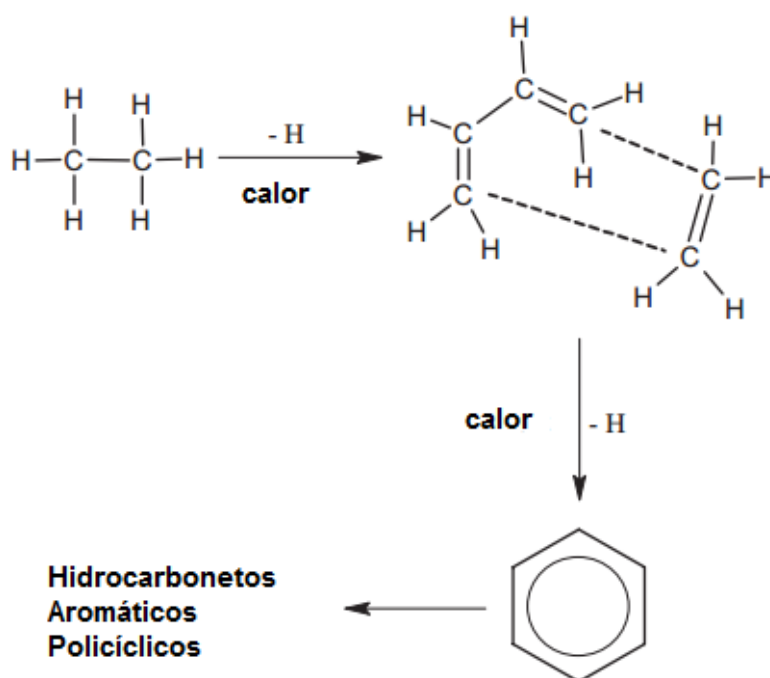


Figura 2.2 Formação de PAHs: Pirossíntese. Adaptado (27)

2.3.6. Toxicidade dos PAHs

Em 1755, Percival Pott realizou em Londres os primeiros estudos sobre a atividade carcinogénica dos PAHs devido ao aumento de incidência de cancro de escroto em limpadores de chaminés, como resultado da exposição à fuligem. Trabalhos realizados por Pott constituíram mais tarde um incentivo na pesquisa destes compostos, sendo que em 1920 ocorreram as investigações mais importantes nesta área (25).

Desde então, diversas pesquisas epidemiológicas estabeleceram uma relação entre a exposição de PAHs e o risco elevado de diversos tipos de cancro, nomeadamente do pulmão e pele, assim como do estômago, esófago, faringe e vias urinárias. Assim sendo, a crescente preocupação com os PAHs nos alimentos e no meio ambiente, tem vindo a aumentar, devido à facilidade com que são absorvidos pelo organismo através da inalação, pele ou ingestão, levando ao aparecimento de diversos tipos de doenças carcinogénicas e mutagénicas.

A ação exercida por estes compostos é ativada durante o seu processo metabólico, resultante da ação dos sistemas enzimáticos endógenos. Uma grande diversidade de enzimas está envolvida na metabolização destas substâncias, podendo contribuir para a formação de metabolitos inócuos, que são excretados, ou alternativamente originar metabolitos ativos que têm a capacidade de se ligarem ao ADN, e consequentemente originar tumores (Figura 2.3) (29).

Segundo a IARC, os PAHs são classificados de acordo com a evidência de compostos cancerígenos em humanos e em animais experimentais, como apresentado na Tabela 2.4.

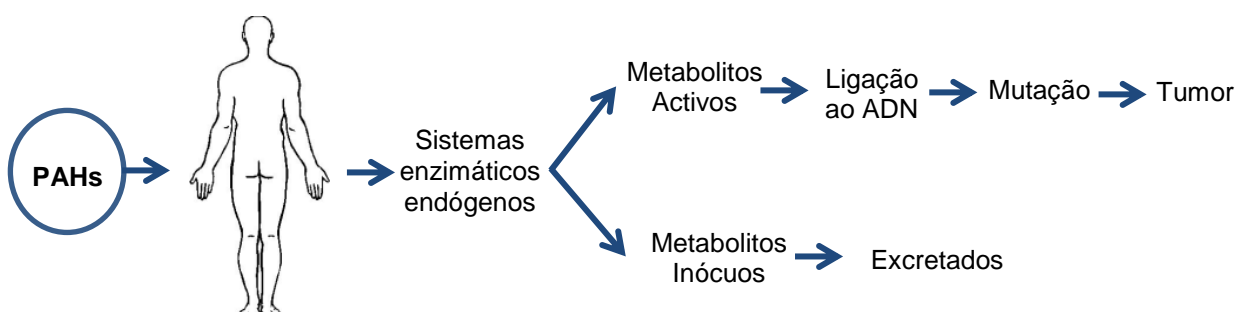


Figura 2.3 Processo de exposição de PAHs na saúde humana. Adaptado (29)

A quantidade absorvida por inalação varia de acordo com a poluição atmosférica, que está diretamente relacionada com a urbanização, o tráfego de veículos e com o tipo e a industrialização local. Em ambientes fechados, a presença do fumo do cigarro e as fontes de aquecimento podem contribuir para o aumento dos níveis ambientais de PAHs (25).

A absorção dérmica apresenta bastante impacto em diversas atividades industriais, sendo responsável por até 90% da quantidade absorvida pelo organismo.

Os alimentos representam outra fonte importante de exposição de PAHs, devido à deposição atmosférica sobre vegetais, frutas e grão, para além da sua formação durante o cozimento.

Estudos realizados com pessoas não-fumantes e não expostas estimam uma ingestão diária de 3,12 µg/kg de oito PAHs (benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno) sendo os alimentos, responsáveis por cerca de 96% desta ingestão. O restante é absorvido diretamente do ar (1,6%), da água (0,2%) e do solo (0,4%) (25).

Para além destas substâncias serem consideradas precursoras de ações mutagénicas e tumorais, tem sido atribuídas outras alterações toxicológicas próprias destes componentes, nomeadamente imunossupressão, atividade estrogénica e anticolinesterásica e indução de enzimas microsossomais (22). Assim sendo, devido à seriedade dos efeitos que a exposição aos PAHs pode ter sobre o organismo, fez com que especial atenção fosse dedicada ao desenvolvimento de metodologias analíticas para identificação e determinação da concentração absorvida.

Tabela 2.4 Classificação dos 8 PAHs segundo a IARC. Adaptado (26)

PAHs	Classificação ³
Benzo[a]antraceno	Grupo 2B
Criseno	Grupo 2B
Benzo[b]fluoranteno	Grupo 2B
Benzo[k]fluoranteno	Grupo 2B
Benzo[a]pireno	Grupo 1
Dibenzo[a,h]antraceno	Grupo 2A
Benzo[g,h,i]perileno	Grupo 3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	Grupo 2B

³ Grupo 1 - Carcinogénico para os humanos

Grupo 2A e 2B - Possivelmente carcinogénico para os humanos

Grupo 3 – Não classificado quanto ao carácter carcinogénico para humanos

Grupo 4 – Provavelmente não carcinogénico para os humanos

2.3.7. Presença de PAHs em óleos vegetais

A incidência de PAHs nos alimentos e bebidas representa nos dias de hoje uma das maiores fontes de exposição humana a este tipo de compostos. Os alimentos podem ser contaminados a partir de PAHs dispersos no meio ambiente (água, ar e solo), no processamento industrial (etapas que envolvem aquecimento, fumagem e secagem) e cozimento (grelhar, assar e fritar) (21).

Tendo em consideração que os óleos e gorduras vegetais constituem um grupo relevante de PAHs na alimentação, devido à sua natureza lipofílica, é importante conhecer a origem da contaminação e avaliar os riscos para a população em geral.

Os óleos vegetais, naturalmente livres de PAHs, são contaminados por diferentes vias, tais como a combustão dos solos, a poluição atmosférica, os tratamentos térmicos utilizados na sua preparação e manufatura (como secagem direta dos grãos/sementes com gases de combustão antes da extração e contacto direto com os solventes extratores), os resíduos de óleo mineral contaminado e material de embalagem (30).

No entanto, estudos indicam que a maior fonte de contaminação de óleos e gorduras advém principalmente de poeiras presentes no meio atmosférico, acolhendo grandes quantidades de PAHs, que se depositam nos campos agrícolas durante o período de desenvolvimento das plantas afetando assim o produto final (25).

2.3.7.1. Influência da Refinação

Estudos realizados, indicam que as diferentes etapas da refinação têm influência na redução de PAHs, sendo o teor total reduzido em cerca de 72% em óleo de girassol e 87% em óleo de soja (Tabela 2.5). Em ambos os casos, a diminuição de PAHs leves (71% e 88% para óleo de girassol e soja, respetivamente) é significativamente mais elevada do que a diminuição de PAHs pesados (79% e 49% para óleo de girassol e soja, respetivamente) (30).

Em relação as diferentes etapas de refinação, a desodorização apresenta maior impacto na redução total de PAHs, sendo que é responsável pela eliminação de PAHs leves, permanecendo os de maior massa molecular no óleo. Contrariamente, na etapa de branqueamento o tratamento com carvão ativado adsorve principalmente PAHs de peso molecular mais elevado.

Tabela 2.5 Teor de PAHs (ppb) durante o processo de refinação de óleos vegetais. Adaptado (30)

	Óleo de girassol				Óleo de soja			
	Bruto	Neutralizado	Branqueado	Desodorizado	Bruto	Neutralizado	Branqueado	Desodorizado
PAHs leves	15,59	11,06	7,5	4,53	63,59	42,56	43,45	7,79
PAHs pesados	1,77	0,73	0,46	0,37	1,74	1,6	1,25	0,89
Total	17,36	11,8	7,96	4,9	65,33	44,16	44,71	8,67
% de redução	-	32	54,1	71,8	-	32,4	31,5	86,7

2.4. Método analítico de determinação de PAHs

Sendo a alimentação a principal via de exposição dos humanos a estes compostos, é importante a determinação de PAHs nos alimentos de modo a avaliar o risco carcinogénico. Neste contexto, ao longo dos anos, foram desenvolvidas diversas técnicas de análise que têm como objetivo obter resultados satisfatórios a baixo custo. Assim sendo, devido ao elevado número de amostras analisadas na indústria é necessário desenvolver um método que seja simples, rápido e economicamente viável.

- **Preparação de amostras**

Durante a preparação das amostras deve-se proceder ao armazenamento adequado das amostras, e reduzir-se ao mínimo o contacto com os plásticos, preferindo o uso de material de vidro previamente lavado (18).

Sendo estes compostos pertencentes a um grupo de diferentes solubilidades e volatilidades deve-se também ter especial cuidado, na etapa de evaporação de solventes, para evitar perdas dos voláteis com reduzidos números de anéis, como é o caso do criseno e benzo[a]antraceno (31).

Relativamente à degradação de PAHs, aconselha-se a redução ao máximo do contacto com o ar e a luz, de modo a evitar a decomposição dos compostos e aumentar as taxas de recuperação.

- **Método de extração em fase sólida (SPE)**

A extração em fase sólida é atualmente umas das técnicas mais utilizadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, tendo sido realizada neste trabalho, para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido (ELL).

As vantagens apresentadas pela SPE são o menor consumo de solvente orgânico, elevadas percentagens de recuperação de analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar a concentração de analito, assim como a disponibilidade comercial em equipamentos e adsorventes. Como desvantagens, a SPE apresenta elevados custos do equipamento (manifolds) e cartuchos e, possivelmente, a dificuldade em escolher a fase sólida adequada para a aplicação desejada (32).

Os principais objetivos deste método são a remoção de interferentes da matriz, a concentração e isolamento de analitos. A eluição de uma solução de amostra é realizada com o auxílio de uma câmara de vácuo (manifold) e cartuchos constituídos por suportes sólidos com estrutura de sílica ou polimérica, com diferentes grupos funcionais ou polaridades.

Geralmente, os procedimentos de extração em fase sólida incluem quatro fases (figura 2.4):

- 1) Condicionamento da fase sólida com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra. O solvente utilizado no condicionamento dependerá da matriz a ser processada e da fase sólida a ser ativada, selecionando sempre um solvente com características idênticas ao solvente no qual a amostra está diluída (32);
- 2) Inserção da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes (32);
- 3) Limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, ou seja, procede-se a lavagem da coluna com o solvente (*clean-up*) próprio da amostra para que tenha força suficiente para arrastar os interferentes, contudo não os analitos (32);
- 4) Eluição do analito de interesse, em que se deve utilizar um volume pequeno de eluente, de forma que a solução eluída se encontre em quantidade apropriada para análise. O eluente deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eluição dos interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem retidos na fase sólida. O solvente de eluição utilizado deve ter maior força de eluição que o solvente utilizado na etapa anterior, o que é obtido aumentando-se a quantidade de solvente orgânico (32).

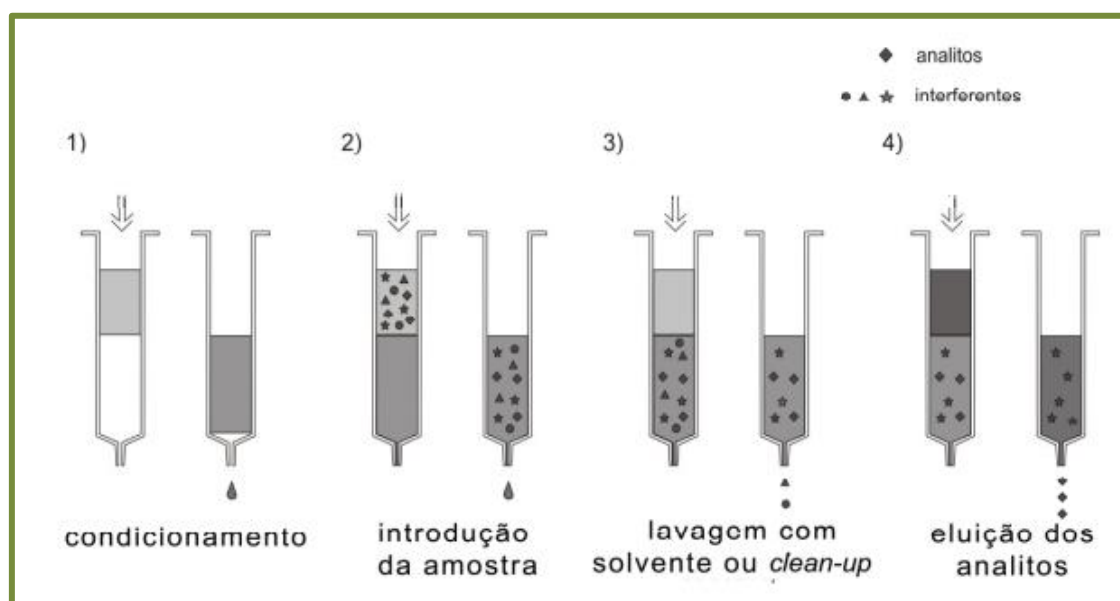


Figura 2.4 Etapas de Extração em fase sólida (32)

Nos últimos anos, a extração em fase sólida tem sido utilizada na determinação de PAHs em alimentos, devido ao reduzido tempo de análise e solventes utilizados. A fase sólida comumente utilizada nos óleos vegetais é sílica quimicamente ligada a C8, C12, C18, ciclohexilo, fenilo e aminopropil. Os melhores valores de recuperação foram obtidos com o cartucho C18 e hexano como eluente. Contudo, para otimizar as taxas de recuperação, há fatores a ter em conta, como o

acondicionamento do cartucho, a velocidade de passagem da amostra, a concentração de PAHs na amostra, a secagem após passagem e os solventes de eluição utilizados (32).

Sendo as concentrações muitas baixas de PAHs e os analitos apresentarem características químicas distintas e matriz complexa, é necessário a realização prévia da preparação da amostra, que tem como objetivo a remoção de interferentes da matriz, assim como a concentração e o isolamento dos analitos de interesse. O método de preparação da amostra deve ser tão simples quanto possível, uma vez que reduz o tempo de análise, assim como o número de etapas que possibilita a introdução de erros (32).

- **Separação e Deteção Cromatográfica**

A quantidade de PAHs extraída e isolada dos alimentos é uma mistura complexa de diversos compostos, que exige métodos de separação eficientes e com elevada resolução. Existem diferentes técnicas analíticas para a separação e determinação destes carcinogêneos em matrizes alimentares, como cromatografia gasosa (GC), cromatografia de líquida de elevada eficiência (HPLC), cromatografia com fluídos supercríticos (SFC), cromatografia em camada fina (TLC) ou a electroforese capilar (CE). No entanto, os métodos mais utilizadas na análise quantitativa de PAHs em óleos vegetais são GC e HPLC, sendo cada vez mais comum a utilização de equipamentos UPLC, que permitem separar e analisar amostras complexas.

Entre as vantagens geralmente conhecidas à técnica de HPLC na análise de PAHs, salientam-se a excelente seletividade devido a utilização de uma grande variedade de fases estacionárias, o poder de resolução, deteção, quantificação, assim como uma grande aplicabilidade e rapidez em diferentes tipos de amostras.

Em HPLC utilizam-se colunas com partículas de diâmetros inferiores a 20 μm , o que requer pressões superiores a 100 atm capazes de manter caudais reprodutíveis na gama de 0,1 a 10 ml /min.

A cromatografia líquida em fase reversa é uma das técnicas habitualmente utilizadas para análise de PAHs. Nesta, a fase estacionária é menos polar que a fase móvel e, de forma geral, o tempo de retenção é maior para compostos com menor polaridade ou maior número de anéis aromáticos (33). As colunas comumente utilizadas para a separação de PAHs são as colunas de octadecilo (C18). No entanto, a maneira como estas fases são preparadas é um fator a ter em conta, devido a dificuldade em separar alguns dos compostos. Deste modo, surgiu a necessidade de diferentes produtores (ex. Supelco) produzirem enchimentos C18 específicos para análise de PAHs.

As condições operacionais levadas a cabo por este equipamento são realizadas à temperatura ambiente, sendo a fase móvel uma mistura de água com vários solventes orgânicos, principalmente acetonitrilo ou metanol, estabelecendo um gradiente na proporção adequada de modo a diminuir o tempo de retenção dos compostos menos polares.

O sistema Acquity UPLC, utilizado neste trabalho, foi desenvolvido pela Waters para permitir o uso de velocidades, pressões e fluxos mais elevados relativamente a equipamentos de HPLC comuns. (34) O principal aspeto que diferencia este equipamento de outros é o facto de utilizar colunas empacotadas até 1,7 μm , com pressões de operação de 15000 psi (35).

Em comparação com o HPLC, o sistema UPLC destaca-se por ser uma técnica de separação com maior sensibilidade, resolução e tempos de análise reduzidos (36).

Contudo e, uma vez que o equipamento apresenta características de HPLC e UPLC optou-se pela utilização de uma coluna de 5 μm , tal como preconizado pela norma para o presente estudo. Não obstante, no futuro a utilização de colunas de 1,7 μm seria uma mais valia para a obtenção de melhores resultados a tempo reduzido.

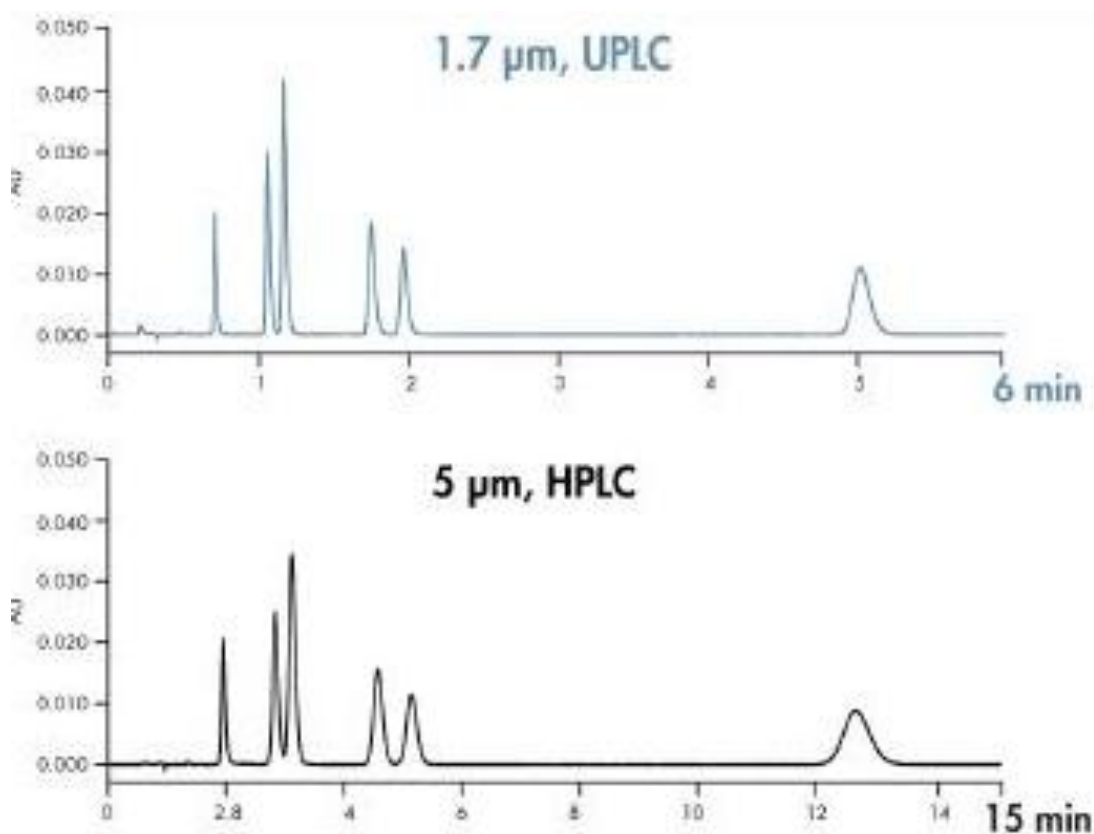


Figura 2.5 Análise Comparativa UPLC vs HPLC (35)

A identificação dos picos cromatográficos dos PAHs é possível através quer dos espectros de absorção no UV quer por fluorescência. No entanto, devido a propriedades fluorescentes da maioria dos PAHs e através da otimização dos comprimentos de onda de excitação e emissão, a utilização de detetores de fluorescência é a técnica mais utilizada no que concerne a sensibilidade e seletividade.

Cada PAH tem um espectro de excitação e emissão por fluorescência característico. Contudo, a detecção por fluorescência apresenta algumas limitações, como por exemplo, a identificação de interferentes nas amostras com a emissão no mesmo intervalo de comprimento de onda do analito de interesse. No sentido de ultrapassar este inconveniente, é possível definir uma detecção seletiva para cada PAH, estabelecendo comprimentos de excitação e emissão específicos.

2.5. Validação de Métodos Analíticos

Sempre que um laboratório utiliza método internos de ensaio, deve determinar alguns parâmetros necessários para a sua validação. Assim sendo, a validação dos métodos internos deve ser adaptada a cada situação de modo a garantir a validade dos resultados (37).

Os requisitos mínimos necessários à validação de um método analítico dependem do tipo de método em causa e englobam diversos parâmetros que foram determinados durante o presente trabalho:

- **Seletividade**

A seletividade é o primeiro passo na validação de um método instrumental de separação e deve ser avaliada continuamente, uma vez que, se não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão do método estarão seriamente comprometidas. A matriz da amostra pode conter elementos que interferem no desempenho da medição, sendo que, estes podem aumentar ou reduzir o sinal, podendo a magnitude do efeito depender da concentração (38).

Assim sendo, a seletividade representa a capacidade que um determinado método possui de identificar e distinguir de forma inequívoca um determinado analito de outros compostos, como interferentes ou substâncias de uma amostra.

Este parâmetro pode ser avaliado procedendo-se à realização de testes de recuperação utilizando uma série de amostras em duplicado, com a mesma matriz, variando apenas a concentração do analito ao longo de toda a gama de trabalho. Convém que as amostras sejam analisadas em duplicado (37). O método analítico só é considerado aplicável quando as taxas de recuperação são próximas de 100%.

- **Curva de Calibração**

Curva de calibração é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações de um dado analito.

Como tal, para o procedimento de calibração são preparadas uma série de soluções padrão em que a concentração a dosear é conhecida.

Habitualmente são necessárias várias gamas de concentração, no mínimo cinco, para construção da curva analítica, sendo a quantidade de replicados em cada faixa de concentração dependente da rotina de laboratório (38).

A escolha do intervalo do método analítico é determinado consoante o nível de concentração do analito que se deseja estudar.

A forma algébrica da equação de uma reta, para obtenção do cálculo da concentração de analito, é dada por (37):

$$y = a + bx \quad (\text{equação 1})$$

Sendo:

y – a resposta medida, ou seja, absorvância, área ou altura do pico;

x – concentração de analito;

b – declive da reta = sensibilidade;

a – ordenada na origem (x=0).

Um dos parâmetros de avaliação da calibração analítica é o coeficiente de correlação linear (r). Este parâmetro pode tomar valores entre -1 e +1, sendo que os valores de coeficientes de correlação devem ser superiores a 0,995, em termos de validação analítica (37).

Através da informação obtida da curva de calibração é possível obter o desvio padrão do método (DP), que é um parâmetro que permite avaliar o desempenho do analista em relação ao trabalho experimental efetuado (37).

Assim sendo, o DP é dado por:

$$DP = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{equação 2})$$

Em que:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual associado à reta de regressão, dado por:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{N-2}} \quad (\text{equação 3})$$

- b é o declive da reta de regressão

Obtido esse valor é possível calcular o coeficiente de variação do método (CV), expresso em %, dado por:

$$CV_m = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

Em que, \bar{x} é a média de valores da concentração dos padrões utilizados.

• Gama de Trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações de analito da amostra em que o método apresenta linearidade, exatidão e precisão de acordo com os critérios de aceitação definidos para o estudo de validação.

Segundo o guia Relacre 13, quando o método envolve a construção de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade de variâncias e a norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau (37).

Como tal, são recomendados 10 pontos de calibração, não devendo ser inferior a cinco, distribuindo-se ao longo de toda a gama de trabalho. O primeiro e último padrão serão analisados em 10 réplicas independentes, no qual se determinam as variâncias do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{equação 5})$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (\text{equação 6})$$

Sendo i o número do padrão que vai de 1 a 10 e j o número de repetição efetuadas para cada padrão (37).

As variâncias são testadas para avaliar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites de trabalho definidos efectuando o seguinte valor teste VT:

a) $VT = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$ quando $S_{10}^2 > S_1^2$

b) $VT = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$ quando $S_1^2 > S_{10}^2$

O valor VT é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade, para um grau de confiança de 95% ou 99%.

- Se $VT \leq F$ as diferenças de variâncias não são significativas e gama de trabalho está bem ajustada.

- Se $VT > F$ as diferenças de variâncias são significativas o que implica a redução da gama de trabalho até que as diferenças de variâncias relativas ao 1º e último padrão não seja significativas.

• Linearidade

A linearidade de um método pode ser estudada pela curva de calibração obtida dos resultados em ensaios em função da concentração de analito e verificada segundo o cálculo e análise do coeficiente de determinação (r^2). No entanto, os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade.

Devem ser por isso efetuados outros testes de linearidade, nomeadamente:

- a) Teste das áreas normalizadas que tem como objetivo avaliar a dispersão dos valores obtidos na curva de calibração em relação aos valores ótimos, por forma a que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

Para concluir a existência de linearidade, numa determinada gama de trabalho, foi definido que os valores normalizados deverão estar compreendidos entre 85 - 115%.

Para o cálculo da área normalizada, a concentração corresponde ao ponto experimental com melhor correlação, ou seja, o que mais se aproxima de 1.

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\left(\frac{A_i}{C_i}\right) \times (100 \times C_{100})}{A_{100}} \quad (\text{equação 7})$$

Em que A_i corresponde a área do pico a uma determinada concentração e C_i a concentração correspondente a essa área. A_{100} e C_{100} correspondem a área e concentração do ponto experimental de melhor correlação, respetivamente (39).

- b) Teste da análise de resíduos que é um bom indicador de linearidade, sendo a determinação dos resíduos segundo o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da área da curva de calibração (em percentagem). Uma representação gráfica destes valores devem ser aleatórios em torno do eixo do x. Para admitir existência de linearidade, os valores tem de estar compreendidos entre 85-115%. Sempre que apresentarem um desvio maior devem ser excluídos e reduzido a gama de concentrações até que se comprove linearidade (40).
- c) Teste de RIKILT que permite a análise da linearidade em cada ponto da reta. Primeiro para cada concentração x e resposta instrumental y, calcula-se a razão entre eles. De seguida, procede-se ao cálculo da média de todas as razões para todos os pontos de calibração, sendo a este atribuído um valor de 100%. Assim sendo, obtém-se a percentagem da razão em relação ao valor médio.

Para uma linearidade perfeita, cada ponto deveria dar um valor de 100%. No entanto para admitir linearidade numa determinada gama de trabalho, os valores não podem apresentar um desvio superior a 10%, ou seja tem de estar compreendidos entre 90-110%. Caso não se verifique o requisito esperado os pontos devem ser rejeitados e o gráfico realizado novamente até que se comprove linearidade da gama de trabalho (41).

- d) Teste de Mandel (modelo estatístico segundo a norma ISO 8566-1) onde calcula-se as funções de calibração linear e polinomial, assim como os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} . Pelo cálculo das diferenças de variâncias (DS^2) pela seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y2}^2 \quad (\text{equação 8})$$

Calcula-se o valor teste, PG:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (\text{equação 9})$$

Este valor compara-se com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade e uma probabilidade de 95%:

- Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear;
- Se $PG \geq F$: a função de calibração é não linear (37).

- **Sensibilidade**

A sensibilidade é determinada pelo quociente entre o acréscimo do valor lido e a variação da concentração correspondente aquele acréscimo.

Este parâmetro permite assim avaliar a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas variações de concentração de um analito. Deste modo, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de 1ª ordem da curva de calibração nessa zona de concentração (37).

No caso em que a curva de calibração seja definida para um modelo linear, a sensibilidade será igual ao declive da reta, assim como, constante ao longo de toda a faixa de trabalho.

A determinação deste parâmetro apresenta um carácter bastante importante quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo e quando se compara a sensibilidade para diferentes analitos.

- **Limiares Analíticos**

Os termos limites de quantificação (LQ) e limite de deteção (LD) são utilizados para mostrar a capacidade do método em quantificar/ detetar baixas concentrações de um analito (42).

O limite de deteção corresponde ao teor mínimo em que é possível determinar a presença de analito na amostra, mas não necessariamente quantificado como valor exato. Ou seja, o L.D corresponde a concentração mínima que é possível distinguir de um branco, isto é, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito.

A determinação de uma leitura inferior ao L.D não significa, claramente, a ausência de analito a avaliar. Assim sendo, só se pode afirmar que a concentração do componente em causa é inferior a um certo valor (37).

Para uma abordagem correta do limite de deteção é necessário introduzir duas noções estatísticas:

- O erro do tipo I, que é a probabilidade de concluir pela presença do componente em análise quando de facto não existe esse componente na amostra;
- O erro do tipo II, que é a probabilidade de concluir pela presença de um componente em análise, quando ele de facto não está presente (37).

Para uma análise exata dos limiares analíticos, estes dois tipos de erros devem ser reduzidos.

O limite de deteção pode ser determinado por (43):

$$L.D = 3 \times S_0 \quad (\text{equação 10})$$

Sendo,

S_0 – Desvio padrão correspondentes a várias leituras de um branco ou da solução da concentração mais baixa do intervalo de linearidade

No entanto, casos em que método envolve a utilização de uma reta de calibração linear, ter-se-á:

$$L.D = \frac{[3 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (\text{equação 11})$$

Sendo,

b - Declive da reta;

$S_{y/x}$ – Desvio padrão residual da curva de calibração

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade de concentração a partir do qual é possível quantificar um analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na realidade, corresponde habitualmente ao padrão de calibração de menor concentração, rejeitando o branco.

Na generalidade, o limite de quantificação é determinado por (43):

$$L.Q = 10 \times S_0 \quad (\text{equação 12})$$

No entanto, casos em que método envolve a utilização de uma reta de calibração linear, ter-se-á:

$$L.Q = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (\text{equação 13})$$

A atualização destes dois limites deverá ser realizada sempre que se efetuam mudanças de fatores de influência como analista, reagentes e ambiente, equipamento, entre outros. De igual modo, os limiares analíticos devem ser revistos aquando da criação de novas curvas de calibração (37).

- **Precisão**

A precisão permite avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetidos sobre uma mesma amostra. Geralmente as três formas mais fáceis de expressá-la são: por meio de repetibilidade (precisão intra-dia), precisão intermédia (precisão inter-dias) e reprodutibilidade (precisão interlaboratorial), sendo expressas pelo desvio padrão absoluto (s) e coeficiente de variação (CV) (38). É importante referir que grandes valores de desvio padrão estão associados a uma baixa precisão analítica. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia utilizada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método de ensaio, não se admitindo valores superiores a 10% (37) (43).

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (\text{equação 14})$$

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{equação 15})$$

Em que,

x_i – valor individual de uma determinação

\bar{x} – média aritmética das determinações

N – número de determinações (42)

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio efectuando as mesmas condições sobre a mesma amostra. São utilizadas com o mesmo procedimento, analista, equipamento, tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo (37).

A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, materiais de referência ou adição de analito ao branco da amostra em várias faixas de concentração.

Após determinado o desvio padrão dos resultados dos ensaios em condições de repetibilidade é essencial calcular o limite de repetibilidade (r) para decidir se a diferença entre as análises realizadas é significativa.

O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, para um nível de confiança de 95%, a diferença entre dois resultados. Este parâmetro é dado por:

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot s \quad (\text{equação 16})$$

Sendo, t a distribuição Student dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e S o desvio-padrão amostral associado aos resultados para cada gama de concentrações (38).

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando duas ou mais condições como diferentes equipamentos, analistas e dias diferentes. Para a determinação da precisão intermédia, recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (42).

Na maioria dos casos, a partir dos resultados obtidos e após a eliminação de resultados discrepantes é efetuado o seu cálculo.

O valor da precisão intermédia é função do nível de concentração do ensaio, sendo determinado por vários métodos, tais como cartas de controlo de amplitudes, que poderão ser aplicadas a diferentes réplicas e duplicados de amostras ou pela expressão:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (\text{equação 17})$$

Em que $Si_{(j,k)}$ é o desvio padrão da precisão intermédia relativo a esse grupo, onde os símbolos relativos às condições intermédias de precisão podem aparecer entre parêntesis.

Sendo,

n = nº ensaios efetuados por amostra ou padrão;

y_k = cada resultado obtido

\bar{y} = média aritmética de cada resultado obtido (37).

Por fim, apesar de a reprodutibilidade não ser um parâmetro de validação do método efetuado por um único laboratório, é importante o laboratório verificar o desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação conseguidos por comparação interlaboratorial. Para isso, são enviadas uma série de amostras aos laboratórios intervenientes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra. São utilizadas condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra.

Após determinado o desvio padrão em condições de reprodutibilidade, é possível calcular o limite de Reprodutibilidade (R), permitindo assim decidir se a diferença entre os valores das amostras analisadas sob os parâmetros de reprodutibilidade são significantes.

- **Exatidão**

A exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor verdadeiro tido como referência. Quando aplicado a diferentes resultados de ensaios, a avaliação da exatidão implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos.

Os procedimentos habitualmente utilizados para avaliar a exatidão de um método de ensaio, são respetivamente, materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e realização de testes comparativos.

Relativamente aos Materiais de Referência Certificados (MRC), estes devem sempre que possível serem utilizados no processo de validação de um método analítico, uma vez que representam uma importante ferramenta no controlo externo da qualidade de uma análise química. A prática correta desta metodologia permite avaliar o desempenho do laboratório, sendo que os valores obtidos pelo laboratório, tais como a média e o desvio padrão de uma amostra a partir de uma série de ensaios replicados devem ser comparados com os valores de referência certificados.

Uma vez que o valor obtido não se encontra dentro na zona de aceitação para o valor certificado, o laboratório deve procurar os motivos desse desvio e tentar excluí-los (37).

Os ensaios interlaboratoriais dependem do objetivo a que se destinam, podendo ser de aptidão quando se pretende determinar o desempenho dos laboratórios participantes, no qual deve ser relacionado a um MRC, podendo no entanto os intervenientes utilizarem o método que entenderem; ou de normalização quando se pretende estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua repetibilidade e reprodutibilidade (37).

Os testes comparativos consistem na comparação dos resultados obtidos do método interno com os resultados obtidos através de um método de referência. O principal objetivo implícito a este tipo de ensaio é analisar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, ou seja, avaliar a exatidão do método interno com o método de referência (37).

- **Ensaio de Recuperação**

A recuperação, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na proporção analítica do material, que é extraída e passível de ser quantificada (44).

A informação de recuperação pode ser estimada através de materiais de referência certificados (em que a quantidade de substância é conhecida), quando disponíveis, ou de um composto substituto ("surrogate"). O surrogate é definido como um composto adicionado a amostra, no qual o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse. Este composto é considerado substituto, uma vez que é transferido para amostra e pode não ser encontrado no mesmo equilíbrio que se encontra a substância de interesse. Assim sendo, determina-se a recuperação do substituto fazendo uma "correção de recuperação para essa mesma substância (44).

Os compostos substitutos adicionados às amostras podem ser de vários tipos, como padrão da substância adicionado à matriz isenta da substância ou à amostra; ou um composto com

propriedades químicas diferentes da substância de interesse, mas representativo do seu comportamento - padrão interno.

É importante salientar como a eficiência de recuperação varia em função da concentração de analito. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir consideravelmente a altas e baixas concentrações (44).

Posto isto, a recuperação deve ser avaliada em três níveis de concentrações diferentes - baixo, médio e alto - de acordo com a curva de calibração.

Para a avaliação da exactidão do método através de ensaios de recuperação, a taxa de recuperação é calculada segundo a expressão (45):

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \quad (\text{equação 18})$$

Onde:

- C_1 - concentração de analito na amostra fortificada;
- C_2 - concentração de analito na amostra não fortificada;
- C_3 - concentração de analito adicionada à amostra fortificada.

3 . Parte Experimental

3.1. Objetivos

Sendo a exposição a PAHs cada vez mais uma preocupação de saúde pública, devido às suas propriedades cancerígenas, é de extrema importância a sua determinação em alimentos, nomeadamente em óleos vegetais.

O presente trabalho foi desenvolvido tendo por base estudos realizados pela AESA, que concluem que os indicadores mais adequados para avaliar a ocorrência dos PAHs nos alimentos seriam sistemas de 4 ou 8 PAHs.

Neste contexto, e sendo cada vez mais exigido um controlo estrito a estes compostos por parte dos clientes da própria empresa (e não apenas a determinação do B[a]P e a soma dos 4 PAHs – benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno e benzo[a]pireno - sujeitos a limites legais), a presente dissertação teve como objetivos implementar e validar a metodologia analítica de determinação de oito hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em amostras de óleo de girassol.

3.2. Amostras

No presente estudo foram avaliados os teores de PAHs em óleo de girassol bruto e refinado.

Todas as amostras de óleo foram perfeitamente seladas e acondicionadas em embalagens adequadas (garrafas de vidro), tendo sido armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até a sua preparação, de modo a reduzir a fotodegradação dos compostos em estudo.

No decorrer da preparação das amostras, foram tomadas todas as medidas preventivas de modo a minimizar possíveis contaminações, que posteriormente interferissem no processo de separação e deteção cromatográfica.

Cada uma das amostras foram sujeitas duas vezes a extração e purificação, sendo cada um dos extratos injetado. Deste modo, o resultado final corresponde à média das duas injeções, uma de cada extrato.

3.3. Materiais e Equipamentos

De modo a implementar e validar o método analítico foram necessários os seguintes materiais e equipamentos:

- Material de vidro corrente de laboratório;
- Aspirador manual de pipetas de 20,10 e 2 mL;
- Seringas descartáveis de 2 mL;
- Filtros de seringa de 4 mm de diâmetro e 0,2 µL de poro, membrana de Nylon, PP, (*Whatman*);
- Vials âmbar de 10 mL;
- Microseringa de 1 µL e de 250 µL (*Agilent Technologies*);
- Banho termostaticado e ultra-sônico (Bandelin Sonorex RK100 H);
- Balança analítica com precisão de 0,0001g (Mettler Toledo Classic Plus AB-204 – S/FAC);
- Suporte para a corrente de azoto (*Supelco*);
- Suporte para os cartuchos (*Waters*);
- Cartuchos de extração SPE (*Supelco* – *SupelMIP PAHs SPE Column 50 mg/3ml – ref. 52773 - U*);
- Coluna C18 de fase reversa para PAHs com partículas de 5 µm e com as dimensões 250x4,6mm (*Supelco*);
- UPLC (*Waters Acquity H-Class*);

3.3.1. Cuidados e modo de utilização - UPLC

O equipamento utilizado para a detecção e quantificação de PAHs é constituído por um detetor de fluorescência (1), um detetor de PDA (2), um auto-sampler (3), um injetor automático (4), uma bomba/desgasificador (5) e um forno (6), como descrito na Figura 3.1.

Durante a utilização do equipamento, são necessárias algumas medidas preventivas para minimizar o seu desgaste, sendo os filtros de solvente lavados semanalmente em ultrasons e trocados os frascos de solventes que possuem água no seu interior, de modo a evitar contaminações futuras.

Aquando da utilização do equipamento existe uma ordem que deve ser seguida para ligar e desligar o UPLC: auto sampler, bomba, detetor de PDA e FLR.

Posteriormente, é necessário purgar todas as linhas e proceder à lavagem externa e interna da seringa, assim como efetuar a estabilização da coluna utilizando como solvente a primeira linha de gradiente.

Após a criação de uma sequência para cada amostra, realiza-se a injeção das soluções nas condições operacionais favoráveis ao método.



Figura 3.1 Equipamento UPLC

3.4. Solventes e Reagentes

Para preparação das amostras e posterior análise cromatográfica são necessários os seguintes solventes e reagentes de grau HPLC:

- Acetato de Etilo (Fisher, 99,98% de pureza)
- Acetonitrilo (Fisher, 99,99%)
- Ciclo – hexano (Panreac, 99,9% de pureza)
- Tetra - hidrofurano (Chem-Lab, 99,8% de pureza)
- Água

Tanto a água como o acetonitrilo presentes no UPLC para análise cromatográfica foram filtrados por filtros de solventes presentes em cada linha.

Para além disso, foi utilizado uma corrente de azoto (Air Liquide) para purificar a amostra, de modo a evaporar o solvente e a concentrar os PAHs em estudo.

3.5. Padrões

Para a preparação das soluções-padrão referidas no capítulo 3.6, são necessários os seguintes padrões:

- Benzo[a]Antraceno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer
- Criseno 100 mg, Fluka
- Benzo[b]Fluoranteno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer
- Benzo[k]Fluoranteno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer
- Benzo[a]Pireno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer
- Dibenzo[a,h]Antraceno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer
- Benzo[g,h,i]Perileno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer
- Indeno[1,2,3-cd]Pireno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer
- Benzo[b]Criseno 10 ng/μL em Acetonitrilo, Dr.Ehrenstorfer (Padrão Interno)

As soluções padrão certificadas foram conservadas em ambiente frio, acondicionadas nas respetivas embalagens originais e no escuro de forma a evitar a volatilização e fotodegradação dos PAHs.

Antes de proceder à preparação das soluções com diferentes concentrações, os padrões permaneciam no mínimo 1 hora à temperatura ambiente.

3.6. Preparação de Soluções

❖ Soluções de Reagentes

Na realização do procedimento experimental é somente utilizado uma solução de Acetonitrilo: Tetrahydrofurano (90:10), preparada nas quantidades necessárias aquando da sua realização.

❖ Soluções - Padrão

Para a quantificação dos compostos de interesse foi utilizado o método do padrão interno. Como tal, para o estudo dos diversos parâmetros de validação foram inicialmente empregues oito padrões em quantidades conhecidas para a preparação da solução-padrão, às quais se adiciona uma quantidade conhecida de padrão interno.

A escolha da substância usada como padrão interno, deve obedecer a determinados requisitos - apresenta propriedades similares aos compostos a serem quantificados, elui próximo dos compostos de interesse, está completamente resolvido dos restantes picos e não se encontra presente na matriz em estudo.

Este método é extremamente útil, especialmente pelo facto de que é independente de pequenas mudanças nas variáveis experimentais, tais como temperatura da coluna e tamanho da amostra.

A substância utilizada como padrão interno, também foi usada como *surrogate* no presente estudo aquando a realização dos testes de recuperação.

Tendo em conta as propriedades das soluções –padrão, procedeu-se inicialmente a preparação de uma solução de 10 µg/ml de Criseno em acetonitrilo, tendo-se adicionado num balão de 100 mL uma quantidade de 1mg de padrão criseno.

Posteriormente, aquando da preparação da solução-mãe de 100 ppb de 8 PAHs adicionou-se 2 ml de cada PAH no balão de 200 ml, perfazendo o volume total com acetonitrilo. De seguida, realizaram-se as sucessivas diluições de forma a abranger uma gama de concentrações de 0,02 µg/kg a 50 µg/kg.

Por último, preparou-se uma solução – mãe de 100 pbb de benzo[b]criseno e procedeu-se as mesmas diluições da solução anterior, para o estudo da linearidade deste composto, e posterior adição nas soluções de trabalho dos 8 PAHs.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir de uma única solução-mãe, como demonstrado na figura 3.2.

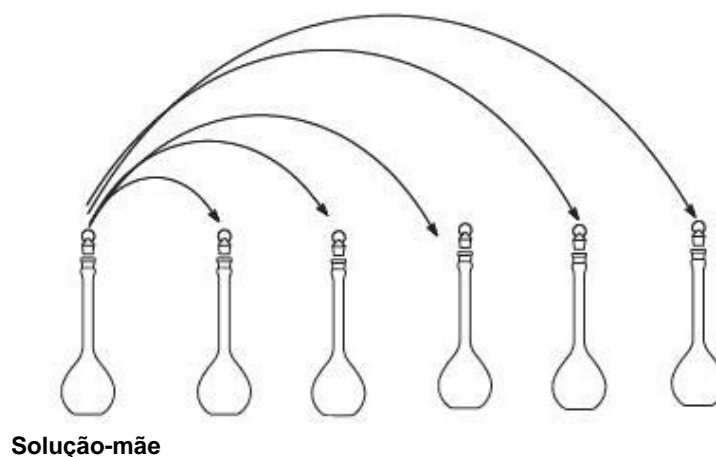


Figura 3.2 Diluições a partir da solução-mãe. Adaptado (44)

Na tabela 3.1, encontram-se os cálculos efetuados para a realização das diluições, tendo por base a seguinte fórmula:

$$C_A \times V_A = C_B \times V_B \quad (\text{equação 19})$$

Em que:

C_A – Concentração da solução padrão de partida;

V_A – Volume da solução de partida;

C_B – Concentração da solução padrão a preparar;

V_B – Volume final da solução;

Tabela 3.1 Cálculos para as respectivas diluições

C_A (ppb)	V_A (ml)	C_B (ppb)	V_B (ml)
100	25	50	50
100	20	40	50
100	15	30	50
100	12,5	25	50
100	10	20	50
100	7,5	15	50
100	5	10	50
100	3,75	7,5	50
100	2,5	5	50
100	1	2	50
100	0,5	1	50
100	0,375	0,75	50
100	0,25	0,5	50
100	0,2	0,4	50
100	0,15	0,3	50
100	0,1	0,2	50
100	0,05	0,1	50
100	0,025	0,05	50
100	0,010	0,02	50

3.7. Condições operacionais

Numa fase inicial do estudo, procedeu-se a uma análise intensiva das condições operacionais do método de modo a obter resoluções favoráveis de cada composto no menor tempo de análise (ver Anexo A). Como tal, iniciou-se o estudo com a análise de diferentes gradientes com e sem variação da fase móvel (método isocrático), com o objectivo de aumentar as diferenças entre os tempos de retenção. Um dos gradientes das fases móveis estudados foi o mencionado na norma ISO 15753:2006, sendo que não se obtiveram os resultados esperados, ou seja, todos os picos no tempo de corrida estabelecido. O mesmo sucedeu aquando a utilização de um gradiente isocrático de água:acetonitrilo (25:75). O gradiente água:acetonitrilo (15:85) apresentou separações satisfatórias no tempo estabelecido, contudo apresentava picos alargados.

Assim sendo, procedeu-se ao estudo da variação de gradiente ao longo do tempo tendo-se observado uma boa resolução cromatográfica dos picos, permitindo assim um aumentando da precisão e exactidão do método. Deste modo, definiu-se o gradiente e o fluxo apresentados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 Gradiente e fluxo de eluição iniciais

Tempo de Análise (min)	Fluxo (ml/min)	A(%)	B(%)
0	1,5	15%	85%
15	1,5	15%	85%
30	1,5	5%	95%
40	1,5	5%	95%
55	1,5	15%	85%
60	1,5	15%	85%

No decorrer do estudo, foi dada especial atenção ao volume de injeção tendo-se iniciado com 20 µL. Contudo após a análise dos diferentes cromatogramas nos diferentes canais de fluorescência concluiu-se que o indeno (1,2,3-cd) pireno apresentava pouca sensibilidade a pequenas quantidades de injeção. Deste modo, procedeu-se ao aumento de volume injetado para 40 µL, tendo-se obtido resultados favoráveis.

Os PAHs em estudo foram detectados por fluorescência, sendo os comprimentos de onda utilizados os definidos pela norma ISO 15753:2006, uma vez que cada PAH tem um comprimento de onda de excitação e de emissão específicos. Estes mostraram resultados satisfatórios de selectividade e sensibilidade.

Tabela 3.3 Critérios de deteção. Adaptado (24)

Componentes	t _{retenção} (min)	Canal FLR	λ _{excitação} (nm)	λ _{emissão} (nm)
Benzo[a]Antraceno	7,7	B	270	385
Criseno	8,7			
Benzo[b]Fluoranteno	12,6	A	256	446
Benzo[k]Fluoranteno	15,2	D	292	410
Benzo[a]Pireno	18,1			
Dibenzo[a,h]Antraceno	23,0			
Benzo[g,h,i]Perileno	25,7			
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	28,0	C	274	507
Benzo[b]Criseno	32,1	A	256	446
		B	270	385
		C	274	507
		D	292	410

Já numa fase final do estudo, e após o início da validação ocorreram avarias no equipamento (bomba e injetor), sendo necessário a realização de novos estudos das condições operacionais. Contudo, por falta de tempo manteve-se o que descrito anteriormente, a exceção do gradiente que foi otimizado, tendo-se obtido os tempos de retenção indicados na tabela 3.3.

Assim sendo, as condições operacionais finais são as seguintes:

- **Fase Móvel:** Solvente A - Água
Solvente B – Acetonitrilo
- **Volume de Injeção:** 40 µL
- **Temperatura da coluna:** 25°C
- **Temperatura do Auto Sampler:** 20°C
- **Gradiente e fluxo de eluição:**

Tabela 3.4 Gradiente e fluxo de eluição finais

Tempo de Análise (min)	Fluxo (ml/min)	A(%)	B(%)
0	1,5	15%	85%
15	1,5	15%	85%
30	1,5	5%	95%
35	1,5	5%	95%
40	1,5	15%	85%
45	1,5	15%	85%

3.8.Procedimento Experimental

No presente estudo procedeu-se à realização de extração e purificação em fase sólida das amostras, com os seguintes passos:

1. Preparar o cartucho SupelMIP eluindo, por ação da gravidade, o cartucho inteiro com 3 mL de ciclo hexano. Submeter a vácuo (ATENÇÃO: Não deixar secar completamente).
2. Num balão de fundo plano de 10 mL, pesar 1 g de amostra + 1 mL de ciclo hexano e adicionar ao cartucho.
3. Lavar o balão da amostra com ciclo hexano (2 mL) para arrastar os resíduos da amostra que ficaram no frasco. Adicionar novamente ao cartucho.

NOTA: o que fica nos copos despreza-se ficando os PAHs na fase estacionária do cartucho

4. Fazer a eluição, por ação da gravidade, dos PAHs com 3 mL de acetato de etilo para um vial de 10 mL.
5. Evaporar até à secura o eluato de acetato de etilo obtido a partir do cartucho purgando com uma corrente de azoto.
6. Dissolver o resíduo com 200 µL de uma mistura de Acetonitrilo: Tetrahidrofurano (90:10)
7. Recolher para uma seringa de 2 mL. Filtrar através de um filtro de seringa e verter completamente a mistura para um vial, ao qual é adicionado uma quantidade conhecida de padrão interno.
8. Colocar o vial na posição indicada no auto-sampler do equipamento.

3.9. Análises Efetuadas

3.9.1. Seletividade

Nos métodos cromatográficos a resolução é um bom indicador de seletividade. Como tal, compara-se o cromatograma do padrão com o cromatograma de umas das matrizes fortificadas com uma concentração robusta.

3.9.2. Curva de Calibração

Para determinar a curva de calibração de cada composto foi necessário proceder à diluição da solução-mãe a diferentes concentrações de PAHs, como apresentado na tabela 3.1. As mesmas concentrações foram estudadas para a curva de calibração do padrão interno.

Para cada concentração analisada, optou-se apenas por efectuar um replicado, uma vez que não é conhecida a estabilidade dos padrões ao longo do tempo.

3.9.3. Linearidade

Para o estudo da linearidade, recorreu-se a diferentes testes estatísticos (teste das áreas normalizadas, teste da análise de resíduos, teste de RIKILT e teste de Mandel) para determinar a gama de trabalho que mais se ajustava aos pontos experimentais de cada curva.

3.9.4. Limiares Analíticos

Para determinação dos limiares analíticos (LD e LQ), foram efetuados 10 replicados da menor concentração que é possível distinguir de um branco aquando da realização das curvas de calibração.

3.9.5. Precisão

A repetibilidade é determinada efetuando ensaios sobre uma mesma amostra, utilizando o mesmo equipamento e mesmo analista em curtos intervalos de tempo. Como tal, realizaram-se 10 replicados de uma amostra de óleo de girassol refinado, sem qualquer contaminação intencional.

A precisão intermédia é determinada efetuando ensaios sobre uma mesma amostra, utilizando o mesmo equipamento e o mesmo analista, mas em dias diferentes. Como tal, realizaram-se 10 replicados da mesma amostra de óleo de girassol, em dois dias diferentes.

3.9.6. Exatidão

Para avaliação da exatidão do método recorreu-se a ensaios interlaboratoriais não oficiais, tendo sido enviado uma amostra de óleo de girassol refinado e bruto para dois laboratórios. Participando o Laboratório da Sovena em ensaios interlaboratoriais, foi possível, através de um óleo de girassol refinado enviado pelo BIPEA realizar o mesmo tipo de procedimento em estudo e comparar os resultados obtidos para os 4PAHs.

Em relação aos ensaios de recuperação, estes foram realizados em amostras de girassol bruto e refinado, sendo as determinações efetuadas em duplicado. Nestes ensaios é analisada uma amostra com contaminação natural de PAHs, ou seja, que não tem qualquer contaminação propositada, e ainda, analisada uma amostra que é propositadamente contaminada.

4 . Resultados e Discussão

Para a validação do método interno de ensaio para a determinação dos oito hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em óleo de girassol, por HPLC, com a utilização de uma coluna de fase reversa e detetor de fluorescência (FLR), foram analisados cinco parâmetros característicos, que incluem a seletividade, a linearidade, os limiares analíticos (limites de detecção e quantificação), a precisão e exatidão do método.

É importante salientar que o método usado no desenvolvimento deste estudo é um método interno - método que não segue uma norma (nacional ou internacional) ou documento normativo equivalente – embora já exista atualmente uma norma ISO 15753 para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em óleos e gorduras de origem animal e vegetal. No entanto, devido aos elevados custos envolvidos, assim como duração do trabalho laboratorial definido pela mesma, optou-se por um método com custos reduzidos e com menor tempo para obtenção dos resultados.

4.1. Seletividade

Para quantificar um determinado analito em diferentes tipos de amostras que, por vezes, podem ser bastante complexas e possuírem na sua constituição elementos interferentes, é muito importante averiguar se o método de análise em estudo é seletivo para os analitos em questão.

Como tal, o modo mais prático de avaliar este parâmetro é proceder à comparação de um cromatograma de uma matriz fortificada a uma concentração robusta, com um cromatograma do padrão à mesma concentração, de modo a verificar que os picos são sobreponíveis, isto é, que a matriz não altera a resolução.

Deste modo, e após a realização dos testes de recuperação descritos mais à frente neste capítulo, foi possível comparar uma amostra de óleo de girassol bruto fortificada a uma concentração de 50 ppb com o respetivo padrão à mesma concentração.

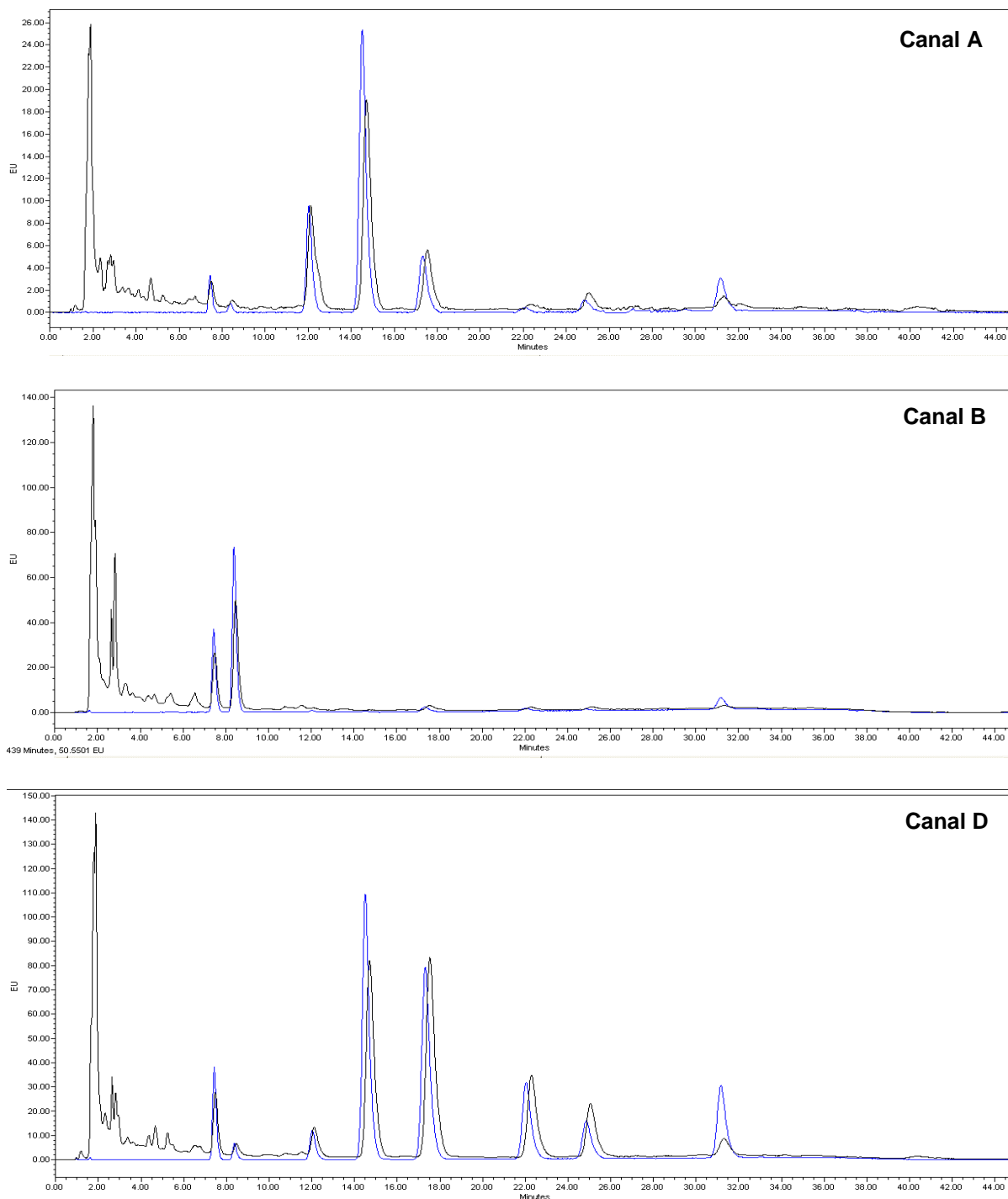


Figura 4.1 Cromatograma de uma amostra de OGB a 50 ppb (preto) e padrão a 50 ppb - Canal A, B e D

Tal como apresentado na figura 4.1, ao efetuar-se a comparação dos três cromatogramas verificou-se que os picos são sobreponíveis, ou seja, a matriz não altera a resolução, confirmando assim a selectividade do método.

4.2. Curva de Calibração

Em análises quantitativas, a calibração consiste num processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com uma concentração conhecida (37). Deste modo, no presente estudo, a concentração de cada composto foi correlacionado, quer com a área de padrão interno (B[b]C), quer com o sinal obtido para a área de cada composto, sem normalização.

A utilização do método do padrão interno tornou mais realistas os valores correspondentes a cada composto, uma vez que pequenas variações de sinal de analito em duas análises cromatográficas da mesma amostra é acompanhada pela variação de sinal do padrão interno.

Como tal, para determinar a quantidade ideal a utilizar, foi necessário proceder ao estudo da linearidade do B[b]C através da construção de uma curva de calibração. Para tal, preparou-se uma solução-mãe de 100 ppb, que se diluiu posteriormente numa gama de concentrações de 0,02 a 50 ppb. Este composto foi estudado nos quatro canais de fluorescência indicados na tabela 3.3.

Na figura 4.2 consta um cromatograma obtido referente ao padrão interno de 10 ppb no canal D, onde se evidencia o sinal obtido, assim como o tempo de retenção (32,3 min).

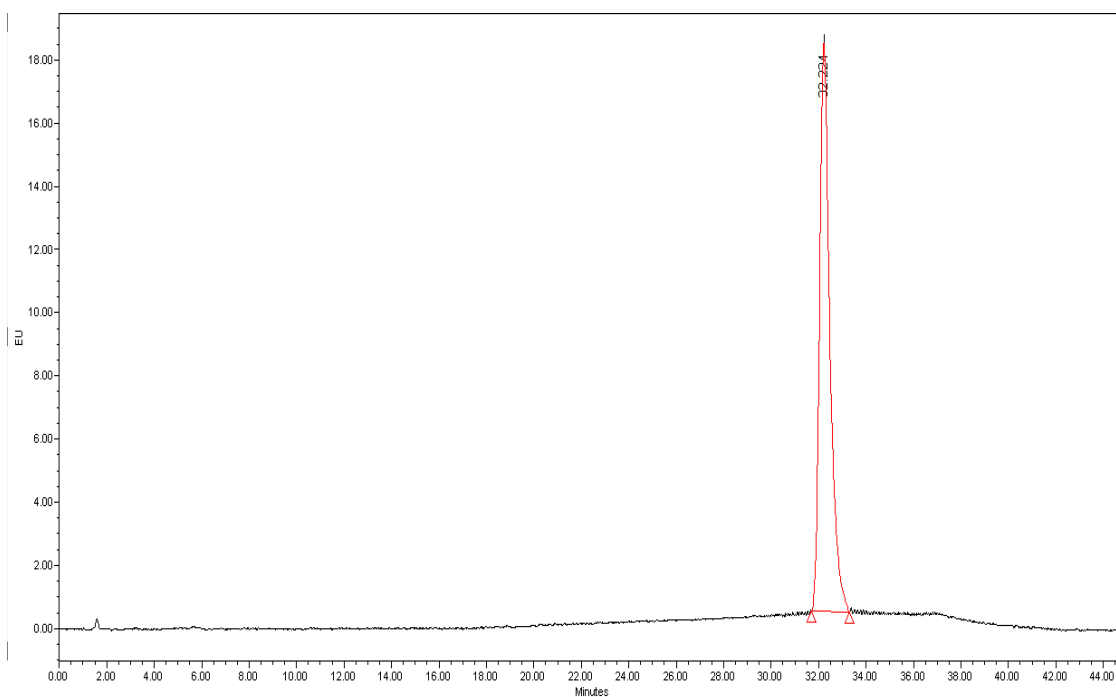


Figura 4.2 Cromatograma do padrão interno a 10 ppb – Canal D

Na tabela 4.1, encontram-se representados os valores referentes aos parâmetros da primeira curva de calibração em cada um dos canais em estudo, para a posterior avaliação de linearidade do padrão interno no método.

Tabela 4.1 Parâmetros da primeira curva de calibração do padrão interno para a avaliação da linearidade do método

Parâmetro	Resultados			
	Canal A	Canal B	Canal C	Canal D
Número de pontos de calibração (N)	10	10	7	15
Intervalo de concentrações (ppb)	2,0-50	2,0-50	10,0-50	0,3-50
Equação da Reta	$y = 55321x + 26732$	$y = 97132x + 71525$	$y = 11749x + 12329$	$y = 545951x + 101039$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,999	0,998	0,962	0,999
Coeficiente de variação do método (CV_m , %)	2,5	3,8	11,3	2,7
Limite de detecção, LD (ppb)	1,6	2,3	9,2	0,7
Limite de quantificação, LQ (ppb)	5,2	7,7	30,8	2,4
Teste das áreas normalizadas (%)	[73,110]	[97,153]	[87,126]	[97,152]
Análise de Resíduos (%)	[60,108]	[88,114]	[82,121]	[70,112]
Teste de RIKILT (%)	[73,112]	[91,144]	[84,121]	[87,137]
Teste de Mandel, $PG \leq F(1, N-3), 95\%$	$0,39 \leq 5,59$	$2,82 \leq 5,59$	$1,49 \leq 7,71$	$0,91 \leq 4,84$

Analisando os resultados obtidos, conclui-se que o modelo de regressão linear é aceite apenas para três dos canais, uma vez que apresenta um coeficiente de correlação superior a 0,995. Contudo este parâmetro, não comprova a linearidade do método tendo-se realizado vários testes estatísticos como demonstrado no capítulo 4.3.

Posteriormente, procedeu-se à construção de uma curva de calibração para os oito PAHs a quantificar, tendo-se preparado uma solução-mãe de 100 ppb e as respetivas diluições nas mesmas concentrações indicadas acima. A cada vial de concentração da solução foi adicionado uma concentração de 15 ppb de padrão interno, determinado após os estudos da linearidade (capítulo 4.3).

Nas figuras de 4.3 a 4.6, são apresentados quatro cromatogramas referentes à solução-padrão de 10ppb para cada um dos canais utilizados, onde se evidencia o sinal obtido e os respectivos tempos de retenção (tabela 3.3).

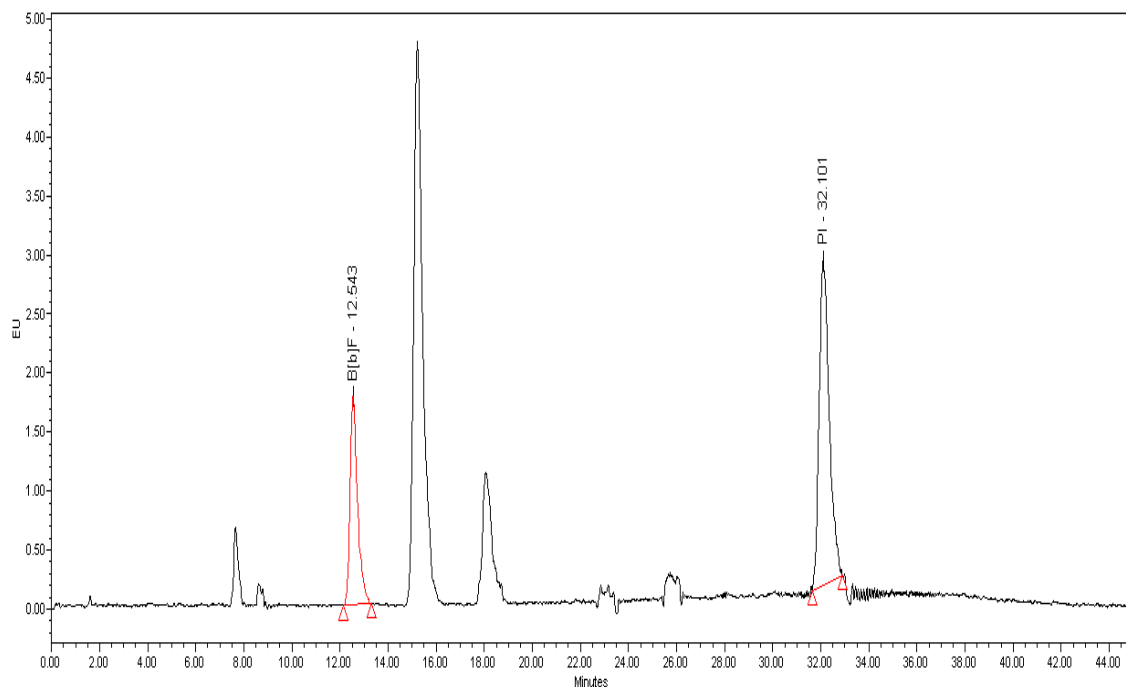


Figura 4.3 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHs para o canal A

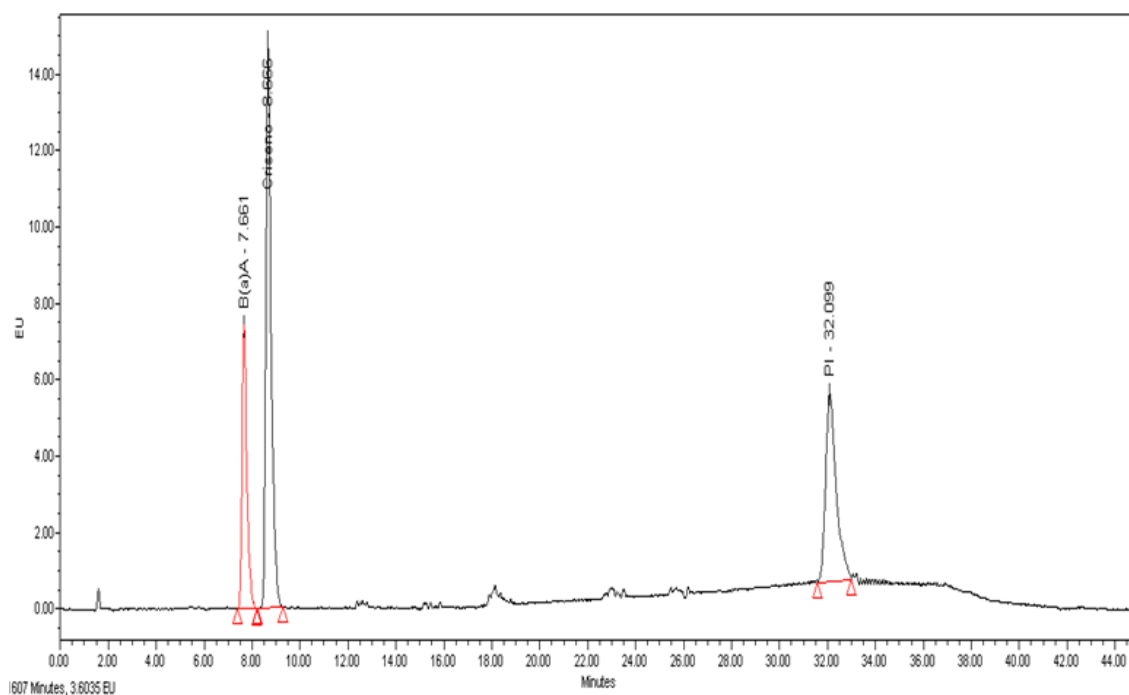


Figura 4.4 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHs para o canal B

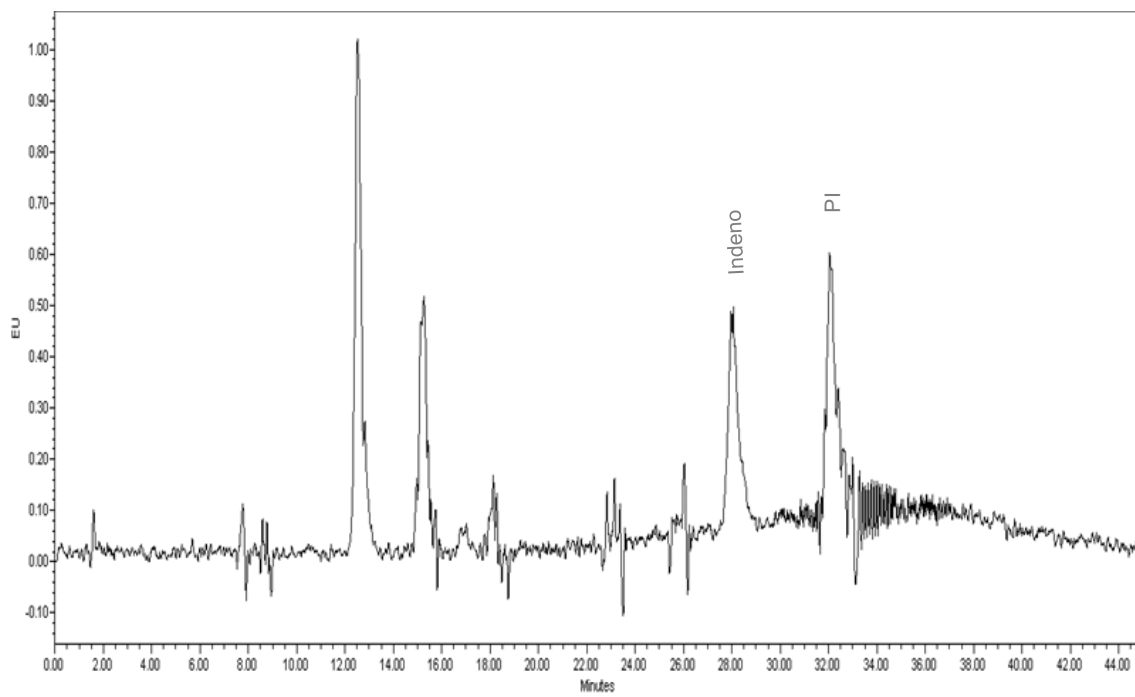


Figura 4.5 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHS para o canal C

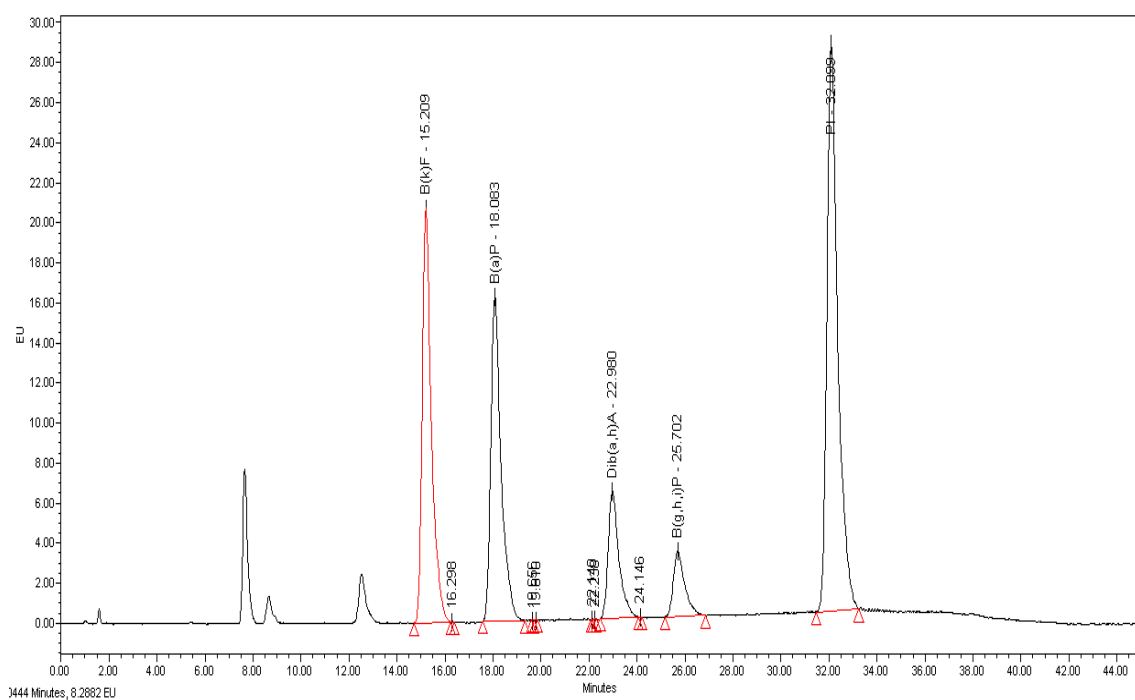


Figura 4.6 Cromatograma de 10 ppb da solução de 8 PAHs para o Canal D

Nas tabelas 4.2 e 4.3, encontram-se representados os valores referentes aos parâmetros da primeira curva de calibração para cada composto, tendo em vista a posterior avaliação de linearidade do método.

Tabela 4.2 Parâmetros da primeira curva de calibração dos 8 PAHs para a avaliação de linearidade do método

Parâmetro	Resultados			
	B[a]A	Criseno	B[b]F	B[a]P
Número de pontos de calibração (N)	19	19	14	19
Intervalo de concentrações (ppb)	0,02-50	0,02-50	0,4-50	0,02-50
Equação da Reta	$Y = 0,0627 x + 0,0023$	$y = 0,1379 x - 0,0053$	$y = 0,0439 x - 0,0084$	$y = 0,0518 x + 0,0092$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,997	0,997	0,996	0,999
Coeficiente de variação do método ($CV_m, \%$)	8,4	8,2	7,6	3,9
Limite de detecção, LD (ppb)	2,8	2,7	3,4	1,3
Limite de quantificação, LQ (ppb)	9,2	9,0	11,3	4,3
Teste das áreas normalizadas (%)	[91,803]	[91,834]	[76,131]	[96,1405]
Análise de Resíduos (%)	[90,277]	[-905, 1551]	[92,140]	[97,143]
Teste de RIKILT (%)	[46,405]	[49,455]	[76,132]	[43,627]
Teste de Mandel, $PG \leq F(1, N-3)$, 95%	$17,64 \geq 4,49$	$19,08 \geq 4,49$	$1,17 \leq 4,84$	$-16,0 \leq 4,49$

Tabela 4.3 Parâmetros da primeira curva de calibração dos 8 PAHs para a avaliação da linearidade do método (Continuação)

Parâmetro	Resultados			
	B[k]F	Dib[a,h]A	B[g,h,i]P	Indeno[1,2,3-cd]Pireno
Número de pontos de calibração (N)	19	19	14	10
Intervalo de concentrações (ppb)	0,02 -50	0,02 -50	0,4-50	2,0 -50
Equação da Reta	y= 0,0599 x+0,0024	y= 0,0218 x - 0,0003	y = 0,0117 x - 0,0012	y = 0,0746 x - 0,036
Coeficiente de determinação (R^2)	0,999	0,999	0,998	0,947
Coeficiente de variação do método (CV_m ,%)	4,1	4,0	4,7	36,5
Limite de detecção, LD (ppb)	1,3	1,3	2,1	12
Limite de quantificação, LQ (ppb)	4,5	4,4	7,0	40
Teste das áreas normalizadas (%)	[96,686]	[62,1303]	[38,105]	[74,131]
Análise de Resíduos (%)	[97,232]	[64,3509]	[51,110]	[71,134]
Teste de RIKILT (%)	[61,432]	[50,759]	[55,153]	[75,130]
Teste de Mandel, $PG \leq F(1,N-3)$, 95%	$10,69 \geq 4,49$	$4,37 \leq 4,49$	$1,00 \leq 4,84$	$1,00 \leq 5,59$

Analisando os resultados obtidos, conclui-se que o modelo de regressão linear é aceite para todos os compostos, exceto para o indeno[1,2,3-cd] pireno, uma vez que apresenta um coeficiente de correlação inferior a 0,995. Contudo, este parâmetro não comprova a linearidade, tendo-se realizado vários testes estatísticos. Relativamente ao coeficiente de variação do método este, apresenta valores satisfatórios para cada composto, exceto para o indeno[1,2,3 – cd] pireno. Este possui uma variação superior a 10 %, o que indica que está muito acima do que é definido.

4.3. Linearidade

Usualmente, o estudo da linearidade da curva de calibração em cromatografia é realizado de acordo com o teste das áreas normalizadas, teste da análise de resíduos, teste RIKILT e teste de Mandel. Na análise de resíduos, os limites podem ser ajustados aos critérios de aceitação da legislação, no que se refere aos critérios de exatidão. Regra geral utiliza-se 15% de variação em relação ao ideal (100%), mas há compostos em que o critério pode aumentar até 25%. No entanto, para obter gamas de trabalho mais robustas, ou seja, com melhor ajuste, é utilizado o teste de RIKILT que apresenta uma variação de apenas 10%.

Na tabela 4.4 apresentam-se os critérios de aceitação internos estabelecidos para avaliação do intervalo de linearidade.

Tabela 4.4 Critérios de Aceitação para a definição do intervalo de linearidade

Parâmetro	Critérios de Aceitação
Coeficiente de determinação (R^2)	$\geq 0,995$
Coeficiente de variação do método (CV_m)	$\leq 10\%$
Teste das Áreas Normalizadas	$\leq 15\%$
Análise de Resíduos	$\leq 15\%$
Teste de RIKILT	$\leq 10\%$
Teste de Mandel	$VT \leq F(1, N-3)95\%$

Analisando a tabela 4.1, os resultados mostram que os pontos apresentam boa correlação apenas para os canais A,B e D ($R^2 \geq 0,995$), mas o intervalo de concentrações não é linear. O coeficiente de determinação e o coeficiente de variação do método cumprem os critérios de aceitação indicados na tabela 4.4, contudo os valores referentes aos testes estatísticos confirmam a falta de correlação dos resultados.

O limite de quantificação provisório (determinado a partir do declive e da ordenada na origem) é muito superior ao primeiro ponto de calibração indicando que os primeiros valores da reta de calibração não estão bem ajustados.

Relativamente ao canal C, os resultados mostram que os pontos não cumprem nenhum dos critérios de aceitação, e o limite de quantificação provisório é muito superior ao esperado.

Assim sendo, o intervalo de concentrações da curva de calibração foi reduzido e os resultados foram posteriormente tratados de modo a cumprir os critérios de linearidade definidos (ver Anexo B).

A tabela 4.5 apresenta os resultados após realizados os testes de linearidade, tendo por base o teste de RIKILT e o teste de Mandel.

Tabela 4.5 Intervalo de Linearidade do padrão interno nos quatro canais de fluorescência em estudo

Parâmetro	Resultados			
	Canal A	Canal B	Canal C	Canal D
Número de pontos de calibração (N)	9	7	5	10
Intervalo de concentrações (ppb)	5,0-50	7,5-50	10,0-50	2,0-50
Equação da Reta	$y = 54717x + 46453$	$y = 97509x + 52276$	$y = 11544x + 12790$	$y = 545114x + 127739$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,999	0,998	0,992	0,999
Coeficiente de variação do método ($CV_m, \%$)	1,6	3	6,2	1,4
Limite de detecção, LD (ppb)	1,0	2,3	5,1	0,9
Limite de quantificação, LQ (ppb)	3,5	7,7	16,8	2,9
Teste de RIKILT (%)	[95,109]	[96,105]	[96,107]	[95,110]
Teste de Mandel, $PG \leq F(1, N-3)$, 95%	$0,63 \leq 5,99$	$7,35 \leq 7,71$	$0,44 \leq 18,51$	$0,57 \leq 5,32$

Após obtenção dos resultados dos testes estatísticos apresentados na tabela 4.5, conclui-se que o método é linear para os canais A, B e D nos intervalos de concentração estudados apresentando, um bom coeficiente de determinação, coeficiente de variação do método inferior a 10% e o valor teste (PG) inferior ao valor tabelado por F de Fisher/Snedecor. Pelo teste de RIKILT, os resultados apresentaram uma variação abaixo dos 10%, apresentando um bom ajuste da gama de trabalho.

Relativamente ao canal C, embora se tenha obtido um coeficiente de determinação não expectável, o ajuste da gama de trabalho se encontra-se dentro dos limites permitidos para os testes estatísticos.

Assim sendo, e analisando as gamas de trabalho obtidas para cada canal, fortificou-se a solução de PAHs de cada nível de concentração com 15 ppb, na tentativa de obter valores expectáveis para a quantificação do indeno [1,2,3-cd] pireno no canal C.

Analisando as tabelas 4.2 e 4.3, os resultados mostram que o intervalo de concentrações estudado apresenta boa correlação ($R^2 \geq 0,995$) para todos os compostos, exceto para o indeno [1,2,3 – cd] pireno. O limite de quantificação provisório (determinado a partir do declive e da ordenada na origem) é muito superior ao primeiro ponto de calibração, indicando que os primeiros valores da reta de calibração não estão bem ajustados. Determinados os valores referentes aos testes estatísticos observa-se que existem valores superiores aos indicados na tabela 4.4, confirmando a falta de correlação entre os resultados.

Assim sendo o intervalo de concentrações da curva de calibração foi reduzido, eliminando pontos fora do intervalo de linearidade e pontos devido a uma má preparação do padrão (ver Anexo C). Deste modo efetuaram-se novos testes estatísticos para a avaliação da linearidade, tendo – se obtido os seguintes resultados:

Tabela 4.6 Intervalo de Linearidade dos 8 PAHs em estudo

Parâmetro	Resultados			
	B[a]A	Criseo	B[b]F	B[a]P
Número de pontos de calibração (N)	10	10	6	7
Intervalo de concentrações (ppb)	2,0-50	2,0-50	0,75-15	2,0-25
Equação da Reta	$Y = 0,0641 x - 0,0412$	$y = 0,142 x - 0,1392$	$y = 0,042 x - 0,0034$	$y = 0,0515 x + 0,0142$
Coefficiente de determinação (R^2)	0,995	0,995	0,999	0,999
Coefficiente de variação do método ($CV_m, \%$)	5,8	5,7	3,9	1,2
Limite de detecção, LD (ppb)	3,5	3,5	0,4	0,4
Limite de quantificação, LQ (ppb)	11,8	11,7	1,5	1,4
Teste de RIKILT (%)	[91,113]	[92,110]	[91,105]	[92,103]
Teste de Mandel, $PG \leq F(1, N-3)$, 95%	$1,66 \leq 5,59$	$-6,99 \leq 5,99$	$-0,89 \leq 10,13$	$-0,15 \leq 7,71$

Tabela 4.7 Intervalo da Linearidade dos 8 PAHS em estudo (continuação)

Parâmetro	Resultados			
	B[k]F	Dib[a,h]A	B[g,h,i]P	Indeno [1,2,3-cd]P
Número de pontos de calibração (N)	7	7	6	6
Intervalo de concentrações (ppb)	2,0-25	1,0-25	5,0-25	2,0-40
Equação da Reta	$y = 0,0598 x + 0,0018$	$y = 0,0218 x + 0,0004$	$y = 0,0116 x + 0,0022$	$y = 0,0678 x - 0,0042$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9997	0,9997	0,9992	0,994
Coeficiente de variação do método ($CV_m, \%$)	1,2	1,5	1,8	7,2
Limite de detecção, LD (ppb)	0,4	0,5	0,7	3,7
Limite de quantificação, LQ (ppb)	1,5	1,6	2,5	12,4
Teste de RIKILT (%)	[99,105]	[93,109]	[99,103]	[75,118]
Teste de Mandel, $PG \leq F(1, N-3)$, 95%	$0,83 \leq 7,71$	$0,04 \leq 6,61$	$-0,14 \leq 10,13$	$1,87 \leq 10,13$

Após a obtenção dos resultados dos testes estatísticos apresentados nas tabelas 4.6 e 4.7, conclui-se que o método é linear apenas para sete dos oito compostos no intervalo de concentrações estudado, apresentando um bom coeficiente de determinação, coeficiente de variação do método inferior a 10% e o valor teste (PG) inferior ao valor tabelado por F de Fisher/Snedecor. Pelo teste de RIKILT, os resultados apresentaram uma variação abaixo dos 10%, apresentando um bom ajuste da gama de trabalho. Contudo, para o benzo (a)antraceno, um dos pontos encontra-se fora dos limites permitidos, no entanto não foi conseguido melhor ajuste, dado que alguns pontos da reta não estavam coerentes devido a uma má preparação do padrão.

Em relação ao indeno[1,2,3-cd]pireno, após a eliminação de três pontos da curva de calibração e posterior ajuste da gama de trabalho, não foi possível obter um bom coeficiente de correlação e valores dentro dos limites permitidos pelo teste de RIKILT. Assim sendo, por falta de tempo para otimizar as condições operacionais para este composto (como por exemplo os parâmetros de detecção) optou-se por não o quantificar no presente estudo.

Deste modo, poder-se-ia ter optado por um valor de concentração de padrão interno a colocar inferior ao estabelecido neste estudo. Contudo, por falta de tempo para avaliar essa possibilidade, decidiu-se proceder à avaliação dos restantes parâmetros com uma concentração de padrão interno de 15 ppb.

4.4. Gama de Trabalho

Após a determinação do intervalo de linearidade para os sete compostos em estudo, aplicar-se-ia o teste de homogeneidade de variâncias aos extremos de concentração dos intervalos obtidos. Contudo, e uma vez obtido um bom ajuste da gama de trabalho para todos os compostos, poderá não se proceder a realização do mesmo (46). Assim sendo, por falta de tempo, optou-se por não realizar o teste da homogeneidade de variâncias.

4.5. Limiares analíticos

Existem diversas formas de determinar os limites de deteção e quantificação de um método, no entanto, apenas serão abordados neste ponto duas maneiras distintas.

Uma delas baseia-se no desvio padrão residual da reta ($S_{y/x}$) e no declive (b). A outra determina-se através de ensaios de repetibilidade, isto é, na determinação do desvio padrão da leitura de 10 soluções padrão independentes, cuja concentração corresponde ao primeiro nível de concentração do intervalo de linearidade (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 Limiares analíticos do método com base nos parâmetros da curva de calibração e condições de repetibilidade

	Método de cálculo associado à equação da curva		Método de cálculo pela análise de 10 replicados independentes	
	LD (ppb)	LQ (ppb)	LD (ppb)	LQ (ppb)
B[a]A	3,5	11,8	0,4	1,2
Criseno	3,5	11,7	0,2	0,8
B[b]F	0,4	1,5	0,2	0,8
B[k]F	0,4	1,5	0,3	1,1
B[a]P	0,4	1,4	0,3	1,2
Dib[a,h]A	0,5	1,6	0,4	1,3
B[g,h,i]P	0,7	2,5	1,1	3,5

Analisando os resultados obtidos para cada um dos métodos de cálculo dos limiares analíticos, verifica-se que os valores não apresentam grandes discrepâncias uns dos outros, exceto para o benzo[a]antraceno e criseno quando se recorre ao método de cálculo associado à equação da curva. Uma possível justificação para estes resultados pode estar ligada ao facto de introduzir mais erros no cálculo, uma vez que resulta de várias manipulações matemáticas que vão introduzindo erros. Segundo o *Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos* uma outra possível justificação para valores irrealistas recorrendo a este método de cálculo deve-se ao facto da falta homogeneidade de variâncias, linearidade até à origem, ou exclusão do branco da curva de calibração (47). Assim sendo, será mais confiável a utilização dos valores dos limiares analíticos obtidos pelo método de

cálculo da análise de 10 replicados independentes, sendo o modo mais comum e correto de avaliar estes dois parâmetros.

Relativamente ao limite de detecção de cada composto, uma leitura inferior não significa a ausência do contaminante na amostra, apenas podendo afirmar-se que, com uma probabilidade de 97,5%, a concentração de cada composto será inferior ao determinado como limite de detecção.

Na bibliografia consultada não existe informação sobre os limites de detecção e quantificação utilizando o mesmo método em estudo, contudo, existem referências a um dos limiares analíticos de cada um dos compostos segundo a Norma ISO 15753:2006 que utiliza HPLC em coluna de fase reversa C18, com um limite de quantificação de 0,2 µg/kg para todos os compostos exceto o benzo[g,h,i]perileno de 0,3 µg/kg e o indeno [1,2,3-c,d] pireno de 1 µg/kg (24). O que se verifica é que o método é mais elaborado, necessitando de mais equipamentos e de uma metodologia de preparação das amostras mais demorada comparativamente à utilizada neste trabalho, permitindo a detecção e quantificação dos analitos a teores mais baixos.

Contudo, apesar do método utilizado detetar e quantificar a concentrações mais elevadas, observa-se que os limiares analíticos são satisfatórios para o tipo de análise efetuada, uma vez que é possível quantificar a soma dos 4 PAHs (máximo legal de 10 ppb) e o B[a]P (máximo legal de 2 ppb).

A atualização dos limiares analíticos deverá ser efetuada sempre que ocorrem alterações de fatores de influência tais como analista, reagentes e equipamento, entre outros (37).

4.6. Repetibilidade e Linearidade do Injetor

Em HPLC, a conformidade do injetor é um parâmetro adicional ao processo de validação, que é importante avaliar de modo a determinar a sua calibração e erros associados às injeções efetuadas.

Deste modo, para os estudos de repetibilidade do injetor, realizaram-se sucessivas injeções das soluções padrão correspondentes ao primeiro ponto da curva de cada composto e a determinação do coeficiente de variação associado às injeções efetuadas (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 Valores do sinal (área relativa) para as 10 injeções das soluções-padrão referentes ao primeiro ponto da curva de calibração para avaliação da repetibilidade do injetor

Injeções	Sinal (Área Relativa)						
	B[a]A	Criseno	B[b]F	B[k]F	B[a]P	Dib[a,h]A	B[g,h,i]P
	2 ppb	2 ppb	0,75ppb	2 ppb	2 ppb	1 ppb	5 ppb
1	0,141	0,273	0,029	0,135	0,123	0,025	0,070
2	0,143	0,272	0,027	0,125	0,112	0,021	0,065
3	0,143	0,271	0,030	0,123	0,111	0,027	0,059
4	0,141	0,260	0,024	0,134	0,116	0,028	0,067
5	0,148	0,254	0,028	0,128	0,111	0,022	0,062
6	0,134	0,280	0,024	0,130	0,113	0,028	0,061
7	0,138	0,252	0,022	0,131	0,111	0,022	0,062
8	0,146	0,283	0,022	0,121	0,104	0,023	0,057
9	0,121	0,260	0,026	0,144	0,123	0,028	0,064
10	0,132	0,264	0,020	0,130	0,109	0,027	0,059
Média	0,139	0,267	0,025	0,130	0,113	0,025	0,063
DP	0,008	0,010	0,003	0,007	0,006	0,003	0,004
CV (%)	5,68	3,99	12,92	5,18	5,26	11,67	6,56

Analisando os resultados obtidos (Tabela 4.9) e tendo em conta que se definiu internamente um coeficiente de variação do método de 10%, este valor está um pouco acima para dois dos compostos estudados, não sendo, no entanto, um valor demasiado elevado para o método utilizado no presente estudo.

Posteriormente, avaliou-se a capacidade de resposta do injetor a variações no sistema realizando-se sucessivas injeções de uma das soluções – padrão, variando o volume de injeção entre cada ensaio. Sendo a capacidade da seringa de 100 µL e por forma a garantir o loop cheio aquando da injeção, a escolha da gama para avaliação da linearidade do injetor foi de 10 a 50 µL.

Assim sendo, procedeu-se à injeção de um solução – padrão de 20 ppb em duplicado, tendo-se obtido a média das áreas para cada composto e avaliada a linearidade dos resultados segundo uma regressão linear, em que se obtiveram os coeficientes de determinação acima dos 0,995 (ver Anexo D).

Deste modo, tendo em conta os valores obtidos pelo estudo da linearidade e repetibilidade, pode-se afirmar que o injetor está em perfeitas condições de funcionamento podendo ser utilizado para quantificar os compostos do presente estudo.

4.7. Precisão

4.7.1. Repetibilidade e Precisão intermédia

Como descrito no capítulo 2.5, para a avaliação da precisão do método de ensaio é necessário determinar a repetibilidade e a precisão intermédia.

Assim sendo, para a avaliação da repetibilidade do método foram analisados 10 replicados de uma amostra de óleo de girassol refinado, nas mesmas condições operatórias, isto é, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório e mesmo dia.

Por sua vez, para avaliação da precisão intermédia foram realizados mais dois ensaios de repetibilidade, sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, mesmo equipamento e analista mas em dias diferentes.

Os cálculos para determinação da concentração de cada composto, foram efetuados recorrendo às retas de calibração obtidas segundo o estudo de linearidade. Para ambos os ensaios foram calculados os coeficientes de variação de repetibilidade e precisão intermédia, como demonstrado na tabela 4.10.

Tabela 4.10 Concentração de cada PAH para a amostra de óleo de girassol refinado analisado em condições de repetibilidade (dia1) e precisão intermédia(dias 2 e 3)

Amostra	Analito	Dia	Concentração ($X_{\text{méd}} \pm \sigma$)	CV (%)	
				Repetibilidade	Precisão intermédia
Óleo de Girassol Refinado	B[a]A	1	2,03 \pm 0,21	10,4	14,3
		2	3,70 \pm 0,17	6,2	
		3	2,48 \pm 0,22	8,8	
	Criseno	1	1,79 \pm 0,09	4,8	4,1
		2	1,86 \pm 0,06	3,0	
		3	1,81 \pm 0,07	3,7	
	B[b]F	1	2,31 \pm 0,25	11,0	9,7
		2	2,44 \pm 0,21	8,9	
		3	2,34 \pm 0,22	9,2	
	B[k]F	1	0,45 \pm 0,04	8,0	9,7
		2	0,50 \pm 0,04	7,2	
		3	0,46 \pm 0,04	9,5	
	B[a]P	1	0,41 \pm 0,06	13,9	16,9
		2	0,57 \pm 0,03	6,0	
		3	0,52 \pm 0,05	10,4	

Pela análise dos resultados obtidos na tabela 4.10 é possível constatar que os coeficientes de variação de alguns compostos em condições de repetibilidade e precisão intermédia se encontram acima dos 10% definidos internamente para o método em causa. Estes valores advêm essencialmente de possíveis perdas durante o processo de extração dos analitos, tendo-se constatado ao longo da fase de eluição do acetato de etilo sobre o cartucho a perda de líquido que fica no seu interior devido à falta de força da bomba. Outro fator que também pode estar a influenciar os valores obtidos, é a fase de evaporação do eluato que poderá causar a volatilização dos compostos. Assim sendo, seria necessário avaliar a pressão da corrente de azoto necessária a este processo.

Relativamente ao Dibenzo[a,h]Antraceno e Benzo[g,h,i]Perileno, estes apresentavam valores abaixo dos limites de quantificação apresentados na tabela 4.8. Contudo isto não significa a ausência do contaminante na amostra, como comprovado nos boletins de análise obtidos pelos laboratórios indicados mais à frente.

Deste modo, visto que os valores obtidos não são demasiados elevados para a natureza do método em causa, é possível confirmar a precisão do método para os vários analitos não só na amostra realizada no mesmo dia, como, também em dias diferentes.

A partir do desvio padrão dos resultados efectuados sob condições de repetibilidade, pode-se determinar o limite de repetibilidade (r), tendo por base a equação 16, sendo $t_{(n-1,1-\alpha)}$ de 2,26 para um nível de confiança de 97,5% e 10 observações.

Tabela 4.11 Limites de repetibilidade segundo ensaios de repetibilidade

Analito	Limite de repetibilidade (ppb)
B[a]A	0,68
Criseno	0,28
B[b]F	0,81
B[k]F	0,11
B[a]P	0,18

Analisando a tabela 4.11, os valores obtidos indicam a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio para a determinação de cada composto, não devendo exceder os respectivos limites.

Para uma validação mais detalhada deste parâmetro, de modo a garantir que o método é preciso independentemente da concentração de analito na amostra, dever-se-iam ter realizado outros estudos de precisão com base em diferentes amostras. Contudo por falta de tempo, não foi possível realizar os diferentes estudos.

4.7.2. Reprodutibilidade

A análise da reprodutibilidade não foi realizada neste estudo, uma vez que apesar de se ter feito uma comparação com resultados obtidos por dois laboratórios acreditados, este não foi realizado ao abrigo das regras de um ensaio interlaboratorial. Os resultados fornecidos, apenas apresentam os valores de concentração de cada um dos compostos, faltando informação essencial como o método utilizado pelo laboratório, o número de replicados ou mesmo os valores de desvio padrão. Como tal, os valores de concentração servem apenas como referência para comparação com os resultados obtidos.

Apesar de a reprodutibilidade não ser um parâmetro de validação de método efetuado por um único laboratório, é importante um laboratório verificar o desempenho do seu método em relação aos dados de validação conseguidos por comparação interlaboratorial (38).

4.8. Exatidão

O estudo da exatidão de um método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados num determinado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de método são os materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e ensaios de recuperação.

4.8.1. Materiais de Referência Certificados (MRC)

Em relação aos materiais de referência certificados, foi consultado apenas uma entidade de reconhecida competência como a FAPAS, tendo-se constatado que não existem materiais de referência certificados para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em óleos vegetais.

Deste modo, procedeu-se à avaliação de outros parâmetros para o estudo da exatidão, nomeadamente, ensaios interlaboratoriais e ensaios de recuperação.

4.8.2. Ensaio Interlaboratoriais

Entende-se por ensaio interlaboratorial a “organização, realização e avaliação de ensaios da mesma amostra por dois ou mais laboratórios diferentes, de acordo com condições pré-definidas” (Guia ISO/IEC43). Como tal, procedeu-se ao envio da amostra de óleo de girassol refinado e bruto para dois laboratórios, que realizaram a determinação dos oito PAHs em estudo, segundo métodos acreditados.

É de salientar que o número de replicados para cada amostra não é o mesmo, uma vez que a amostra de óleo de girassol refinado foi também analisada para o estudo da repetibilidade, enquanto que o óleo de girassol bruto e o óleo de girassol proveniente do BIPEA possui o número de replicados de acordo o que é efetuado na rotina de laboratório.

O tipo de ensaio interlaboratorial realizado é o de aptidão, que se destina avaliar o desempenho dos laboratórios, mais especificamente, estudar a exatidão dos resultados obtidos experimentalmente neste trabalho (37).

Como tal, essa avaliação é realizada recorrendo a seguinte fórmula (“Z-score”):

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (\text{equação 20})$$

Em que:

- X_{lab} – valor obtido pelo Laboratório;
- X_v – valor aceite como verdadeiro, isto é, a média dos valores obtidos no ensaio interlaboratorial;
- S – unidade de desvio, que pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, a incerteza de X_v , ou outro desvio que assente em critérios de exigência da entidade organizadora.

A escala de pontuação que permite avaliar este parâmetro é a seguinte:

$$\begin{aligned} |Z| \leq 2: & \text{ Satisfatório} \\ 2 < |Z| \leq 3: & \text{ Questionável} \\ |Z| > 3: & \text{ Incorrecto} \end{aligned}$$

Uma vez, que os laboratórios participantes não facultaram informação acerca do desvio padrão associado aos resultados procedeu-se ao cálculo do desvio padrão da média dos ensaios dos três laboratórios.

Tabela 4.12 Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais para a amostra de óleo de girassol refinado (ppb)

	Laboratório Sovena	Laboratório X	Laboratório Y	Média	Desvio Padrão	Z-score
B[a]A	2,0	2,9	2,4	2,4	0,5	-0,96
Criseno	1,8	3,1	3,1	2,7	0,9	-1,15
B[b]F	2,3	2,5	1,9	2,2	0,3	0,23
B[k]F	0,5	1,0	0,8	0,8	0,3	-1,08
B[a]P	0,4	1,8	1,8	1,3	0,8	-1,15
Dib[a,h]A	n.d	< 0,2	<0,4			
B[g,h,i]P	n.d	0,8	0,6			

n.d – não detectável

Tabela 4.13 Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais para a amostra de óleo de girassol bruto (ppb)

	Laboratório Sovena	Laboratório X	Laboratório Y	Média	Desvio Padrão	Z-score
B[a]A	4,3	11,5	6,3	7,4	3,7	-0,83
Criseno	2,8	10,9	6,8	6,8	4,0	-0,99
B[b]F	5,9	8,9	5,3	6,7	1,9	-0,41
B[k]F	1,5	5	2,6	3,0	1,8	-0,86
B[a]P	2,4	9,0	6,0	5,8	3,3	-1,03
Dib[a,h]A	0,3	0,7	0,4	0,5	0,2	-0,79
B[g,h,i]P	1,4	4,7	1,1	2,4	2,0	-0,50

Assim sendo, tendo em conta os resultados obtidos na tabela 4.12 e 4.13, pode-se constatar que os valores de Z-score obtidos para ambas as amostras de óleo de girassol se encontram dentro de um nível satisfatório, pelo que se pode verificar a exatidão do método.

Sendo o presente laboratório participante em ensaios interlaboratoriais permitiu trabalhar com uma amostra de óleo de girassol refinado proveniente do BIPEA, e comparar assim a exatidão do método para os 4 PAHs. Contrariamente ao ensaio realizado acima, foi possível ter acesso ao desvio padrão de aptidão para cada composto tendo obtido os seguintes resultados demonstrados na tabela 4.14.

Tabela 4.14 Resultados obtidos para o óleo de girassol fornecido pelo BIPEA - Ensaio de aptidão para os 4 PAHs(ppb)

	Sovena	BIPEA	Média	Desvio Padrão	Z-score
B[a]A	2,49	2,94	2,72	0,61	-0,37
Criseno	1,57	2,46	2,02	1,05	-0,42
B[b]F	2,16	3,63	2,90	0,87	-0,84
B[a]P	0,75	2,72	1,73	0,80	-1,23

Analisando os resultados pode-se constatar que os valores obtidos pelo laboratório para a soma dos 4PAHs encontram-se abaixo do limite legal, contrariamente ao indicado pelo BIPEA. Contudo a exatidão do método é aceite, uma vez que os valores de Z-score se encontram dentro do nível de satisfação permitido.

Outro parâmetro importante na avaliação da exatidão do método é o erro normalizado, em que caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado (U_{lab}), o valor de X_v deve estar dentro do intervalo de incerteza X_{lab} . Quando tal não acontece, este intervalo poderá estar subestimado. Assim sendo, é geralmente empregue o conceito do erro normalizado (En) para avaliação do desempenho:

$$En = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (\text{equação 21})$$

Em que:

U_{ref} – incerteza associada ao valor verdadeiro

Se $|En| \leq 1$, então U_{lab} está bem estimada (37).

Tabela 4.15 Resultados obtidos, pelo Laboratório da Sovena, na análise da amostra do óleo de girassol refinado, englobado no ensaio interlaboratorial e respectivos valores do erro normalizado (ppb)

	Nºreplicados	Média (ppb)	Desvio Padrão (ppb)	E_n
B[a]A	10	2,0	0,21	-0,85
Criseno		1,8	0,09	-1,15
B[b]F		2,3	0,25	0,18
B[k]F		0,5	0,04	-1,07
B[a]P		0,4	0,06	-1,15

Tabela 4.16 Resultados obtidos, pelo Laboratório da Sovena, na análise da amostra de óleo de girassol bruto, englobado no ensaio interlaboratorial e respectivos valores do erro normalizado(ppb)

	Nºreplicados	Média (ppb)	Desvio Padrão (ppb)	E _n
B[a]A	2	4,3	0,73	-0,81
Criseno		2,8	0,31	-0,99
B[b]F		5,9	1,91	-0,28
B[k]F		1,5	0,26	-0,85
B[a]P		2,4	0,38	-1,02
Dib[a,h]A		0,3	0,03	-0,78
B[g,h,i]P		1,4	0,09	0,49

Tabela 4.17 Resultados obtidos, pelo Laboratório da Sovena, na análise da amostra de óleo de girassol BIPEA, englobado no ensaio interlaboratorial e respectivos valores do erro normalizado (ppb)

	Nºreplicados	Média (ppb)	Desvio Padrão (ppb)	E _n
B[a]A	2	2,49	0,17	-0,35
Criseno		1,89	0,20	-0,31
B[b]F		2,16	0,65	-0,67
B[a]P		0,75	0,14	-0,36

Dado o conceito do erro normalizado enunciado acima e comparando os valores obtidos pelo laboratório (nas tabelas 4.15 a 4.17), com os valores de referência obtidos dos ensaios interlaboratoriais, verifica-se que os valores aceites com verdadeiros (X_v) não se encontram dentro do intervalo de incerteza do laboratório, com exceção do benzo[b]flouranteno no óleo de girassol refinado e bruto. Deste modo, utilizando a expressão do erro normalizado para cada composto, obtêm-se valores um pouco acima de 1 em alguns compostos da amostra de girassol refinado, contudo não sendo demasiado elevados pode-se concluir que a incerteza associada ao valor obtido no laboratório está bem estimada.

4.8.3. Ensaio de Recuperação

Para além do parâmetro avaliado anteriormente, é fundamental avaliar a exatidão do método, segundo ensaios de recuperação, procedendo-se assim, à fortificação das amostras a diferentes níveis de concentração (mínima, média e máxima). Contudo, quando se procedeu ao estudo deste parâmetro, a quantidade disponível dos padrões não era suficiente, pelo que, não foi possível proceder à diluição dos mesmos, por forma a diminuir a incerteza associada ao volume, aquando da fortificação das amostras a concentrações menores. Assim sendo, optou-se por fortificar as amostras com uma concentração máxima de 50 ppb (equivalente ao último ponto da curva de calibração), retirando de cada uma das soluções de 10000 ppb, 50 µL para uma amostra de óleo de 10 g.

Às amostras fortificadas adicionou-se um quantidade de padrão interno no início da amostra – surrogate – por forma a determinar a quantidade de analito no decorrer do processo. Para as amostras não fortificadas, designadas por amostras de controlo, adicionou-se a quantidade de padrão interno antes da corrida por forma a determinar a concentração de cada um dos compostos nas amostras.

Os cálculos necessários à determinação das concentrações de analito, foram efectuados quer recorrendo à curva de calibração (cálculo 1), quer através de fórmulas utilizadas diariamente no processo de quantificação dos compostos, quando não se constrói nova curva de calibração (cálculo 2), possibilitando assim, a comparação dos dois modos de cálculo. Para isso, a primeira etapa envolve a obtenção do factor de resposta, o qual se define como:

$$F = \frac{\left(\frac{A_p}{C_p}\right)}{\left(\frac{A_{PI}}{C_{PI}}\right)} \quad (\text{equação 22})$$

onde A_p e C_p são a área do pico e concentração de um padrão do analito, enquanto A_{PI} e C_{PI} são a área do pico e concentração do padrão interno (48).

A concentração de analito na amostra, pode assim ser calculada a partir da equação:

$$C_x = \frac{A_x \cdot C_{PI}}{F_x \cdot A_{PI}} \quad (\text{equação 22})$$

Onde C_x é concentração do analito, F_x é o fator de resposta para esse analito e A_x é a área de pico, respectivo.

Para a avaliação da exactidão do método através de ensaios de recuperação, a taxa de recuperação é calculada segundo a equação 18, enunciada anteriormente.

Nas tabelas 4.18 e 4.19, são apresentados os valores referentes aos dois métodos de cálculo para a determinação das taxas de recuperação.

Tabela 4.18 Taxas de Recuperação (%) - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para o óleo de girassol refinado

	Cálculo 1	Cálculo 2
B[a]A	152	23
Criseno	159	25
B[b]F	386	54
B[k]F	290	51
B[a]P	464	75
Dib[a,h]A	535	101
B[g,h,i]P	845	144

Tabela 4.19 Taxas de Recuperação (%) - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para o óleo de girassol bruto

	Cálculo 1	Cálculo 2
B[a]A	271	49
Criseno	578	49
B[b]F	203	110
B[k]F	236	77
B[a]P	264	90
Dib[a,h]A	120	115
B[g,h,i]P	86	139

Os critérios de aceitação da taxa de recuperação para o presente estudo, foram definidos internamente como sendo uma variação de 10% em relação ao ideal (100%). Pela análise das tabelas 4.18 e 4.19, verifica-se que os resultados obtidos para a mesma amostra, mas usando dois métodos de cálculo distintos são diferentes. O cálculo recorrendo à curva de calibração conduz a resultados demasiado elevados quando comparados com os obtidos pelo método de cálculo quando não é utilizada a curva de calibração diária. Uma possível justificação para estes resultados, segundo estudos já realizados pela IUPAC, advêm da repetibilidade dos ensaios de recuperação e da incerteza na quantidade de analito/padrão colocado na amostra (49).

Em relação ao método de cálculo 2, é possível observar-se para os dois óleos taxas de recuperação demasiado baixas para o criseno e benzo[a]antraceno, podendo estar em causa as perdas destes compostos durante a fase de evaporação da amostra.

Sendo as taxas de recuperação obtidas pela norma ISO 15753:2006 compreendidas entre 70 a 110% para os compostos determinados neste estudo e comparando este valor com os obtidos pelo Laboratório relativamente ao método de cálculo 2, pode-se concluir que o método necessita de melhorias contudo não apresenta valores muito distantes do esperado, tendo em conta a natureza do método.

5 . Propostas para trabalho futuro

Sendo a validação de um método de análise um processo que envolve muitas etapas e, consequentemente muito tempo, não foi possível avaliar todos os parâmetros de forma correta para o presente estudo. Deste modo, seriam necessárias algumas análises importantes de modo a quantificar todos os analitos. Assim sendo, futuramente deverá ser realizado:

- A otimização dos parâmetros de detecção para o canal de fluorescência do indeno (1,2,3-cd) pireno, de modo a obter melhor sensibilidade deste composto ao comprimento de onda de emissão e excitação definidos;
- O estudo de outro padrão interno que auxilie os primeiros compostos em análise;
- A análise ao longo do tempo da estabilidade da curva de calibração, de modo a avaliar a concordância dos resultados da concentração;
- O estudo da homogeneidade de variâncias para confirmar o ajuste da gama de trabalho correspondente a cada composto;
- A otimização das condições operacionais durante o processo de extração e concentração dos analitos. Tendo especial atenção a fase de eluição dos compostos de modo a obter parte do líquido que ainda fica no cartucho, assim como, a fase de evaporação do eluato estudando a pressão da corrente de azoto, de maneira a evitar a volatilização dos compostos de menor peso molecular, como B[a]A e Criseno.
- A participação em ensaios interlaboratoriais oficiais, com a finalidade de estudar a reprodutibilidade do método e consequentemente avaliar a exatidão do mesmo de modo oficial;
- A fortificação de diferentes amostras, numa concentração mínima, média e alta, para um estudo mais pormenorizado da exactidão do método (ensaios de recuperação).
- A determinação dos parâmetros de validação para o óleo de soja, tais como, curva de calibração, estudo de linearidade, gama de trabalho, precisão e exatidão do método. Uma vez que o método em causa apenas foi validado especificamente para o óleo de girassol, seria uma mais valia a determinação dos parâmetros referidos para o óleo de soja.

6 . Conclusões

O desenvolvimento do presente trabalho de implementação/validação de um método para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em óleo de girassol por HPLC é importante em termos de controlo de qualidade e segurança alimentar, uma vez que os compostos estudados representam um dos grupos de contaminantes dos alimentos mais carcinogéneos e genotóxicos.

A existência de uma norma internacional (ISO 15763:2006) para a determinação destes compostos em óleos vegetais, esteve na base da utilização de determinadas condições operacionais, que conduziram à seleção dos parâmetros de deteção e temperatura da coluna utilizados neste trabalho. Contudo, visto que a referida norma requer um maior número de equipamentos e tempo de preparação da amostra, optou-se por um método mais simples e economicamente mais viável para ser utilizado como método em análise de rotina de uma grande quantidade e variedade de amostras.

Após determinadas todas as condições necessárias e tendo-se optado pelo método do padrão interno procedeu-se a validação do método, verificando-se que, a razão das áreas (área do analito/área de padrão interno) se correlaciona linearmente com a concentração (variada) de todos os compostos em estudo, com exceção do indeno [1,2,3-cd] pireno, pelas razões já enunciadas neste estudo.

A linearidade do método foi verificada segundo diversos testes estatísticos, sendo linear para as diferentes gamas de concentração, consoante o composto a determinar. Sendo de 2-50 ppb para o B[a]A e Criseno, de 0,75-15 ppb para o B[b]F, de 2-25 ppb para o B[k]F e B[a]P, de 1-25 ppb para o Dib[a,h]A e, por fim, de 5-25 ppb para o B[g,h,i]P.

Relativamente aos limiares analíticos o método possui os limites de deteção e quantificação enunciados na tabela 4.5 com base na análise de 10 replicados independentes da gama mais baixa de cada composto. Os valores apresentados são satisfatórios dado estarem de acordo com o objetivo da implementação deste método, ou seja, uma vez que não conhecido a soma dos 8 PAHs em estudo, apenas há que ter em conta a soma dos 4 PAHs que é o limite imposto destes contaminantes nos óleos e gorduras vegetais de 10 ppb, assim como, o valor de B[a]P de 2 ppb.

Em termos da precisão do método, este foi avaliado segundo os parâmetros de repetibilidade e precisão intermédia tendo-se obtido um coeficiente de variação de repetibilidade e de precisão intermédia um pouco acima do definido internamente de 10 % para alguns dos compostos. Contudo não sendo valores demasiados elevados, tendo em conta a natureza do método pode afirmar-se que o método é preciso.

Para a avaliação da exatidão do método, tendo em conta os ensaios interlaboratoriais, obtiveram-se valores de Z-score que consideram o desempenho do laboratório a um nível satisfatório, ou seja, estavam compreendidos entre -2 e 2 para todos os compostos presentes no óleo de girassol refinado, bruto e óleo de girassol do BIPEA.

Outro parâmetro que foi tido em conta para confirmar a exatidão do método, foram os ensaios de recuperação tendo – se obtido valores expectáveis para alguns dos compostos, segundo o método de cálculo em que não é utilizada a curva de calibração diária. Sendo as taxas de recuperação obtidas pela norma ISO 15753:2006 compreendidas entre 70 a 110% e, comparando os valores com os obtidos pelo laboratório, pode-se concluir que o método necessita de melhorias contudo não apresenta valores muito distantes do esperado, tendo em conta a complexidade do método.

Conclui-se, assim, que é fundamental melhorar o método validado de modo a obter resultados mais confiáveis, tendo em conta a exigência pretendida para quantificar os compostos presentes em estudo. Assim sendo, será necessário realizar um plano de ações corretivas de modo a melhorar os parâmetros já validados.

7 . Bibliografia

1. **Sovena Consumer Goods** . *Manual da Qualidade*. Portugal : s.n., 2014. Edição 10.
2. **Sovena Group**. [Online] [Citação: 10 de Março de 2015.] <http://www.sovenagroup.com/pt/goods/portugal/fabricas>.
3. *Decreto de Lei Nº106/2005 de 29 de Junho. Diário da República - I Série-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas*. Lisboa : s.n., 2005.
4. **Chen, Y.S., Chen,A.O.** *Quality analysis and purity examination of edible vegetable oils by near-infrared transmittance spectroscopy*. 1995.
5. **Ricardo Felisberto, Luis Lamas, Márcio Lopes, Pedro Sousa, Ana L. Rodrigues.** *LIPOPEROXIDAÇÃO DOS ÓLEOS ALIMENTARES*. Lisboa : Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária, 2011.
6. **Partidário, Ana Maria C.** Perigos Químicos em Óleos e Gorduras Alimentares. *Iniciativa Riscos*. [Online] [Citação: 2 de Março de 2015.] <https://iniciativariscos.files.wordpress.com/2013/02/ana-partidario-perigos-quimicos-em-oleos-alimentares.pdf>.
7. **Codex Alimentarius.** *CODEX STANDARD FOR NAMED VEGETABLE OILS*. 2009.
8. **Freire, Dora Bertina Pacheco.** Controlo de óleo vegetais comercializados na região do grande porto. Porto : Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, 2002.
9. **Sovena Group.** *Fula*. [Online] [Citação: 11 de Setembro de 2015.] http://www.fula.pt/pt/Opcao_Saudavel/Beneficios_Organismo.aspx.
10. **Lidon, F e Silvestre M.M.** *Indústrias Alimentares - Aditivos e Tecnologias*. s.l. : Escolar Editora, 2007.
11. **Qualidade, Controlo da.** *Manual de Boas Práticas de Fábrica*. 2013.
12. *Regulamento (CE) Nº1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006. Jornal Oficial da União Europeia*. Teores Máximos de certos contaminantes presentes no géneros alimentícios, s.l. : Comissão das Comunidades Europeias.
13. *Regulamento (CE) Nº 835/2011 de 19 de Agosto de 2011. Jornal Oficial da União Europeia*. Teores máximos de hidrocarbonetos policíclicos presentes nos géneros alimentícios, s.l. : Comissão das Comunidades Europeias.
14. *Regulamento (CE) Nº1259 de 2 de Dezembro de 2011. Jornal Oficial da União Europeia*. Teores máximos para as dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas nos géneros alimentícios, s.l. : Comissão das Comunidades Europeias.
15. *Regulamento (CE) Nº 1151/2009 de 27 de Novembro de 2009. Jornal Oficial da União Europeia*. Condições especiais à importação de óleo de girassol originário ou expedido da Ucrânia, s.l. : Comissão das Comunidades Europeias.
16. [Online] [Citação: 25 de Março de 2015.] http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/l21290_pt.htm.
17. **Machado, Ana.** Implementação de um Método para a Determinação de Hidrocarbonetos Alifáticos Saturados em Óleo de Girassol por Cromatografia Gasosa. Lisboa : Instituto Superior de Agronomia, 2011.
18. **Jan Alexander, Diane Benford, Andrew Cockburn, Jean-Pierre Cravedi, Eugenia Dogliotti.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. s.l. : The EFSA Journal, 2008. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain.
19. **Skupinska, Katarzyna, Misiewicz, Irena e Kasprzycka-Guttman, Teresa.** *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Physicochemical Properties, Environment appearance and Impact on living organisms*. Poland : Polish Pharmaceutical Society, 2004. ISSN 0001- 6837.
20. **Caruso, Miriam e Alaburda, Janete.** *Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno:uma revisão*. São Paulo - Brasil : Rev.Inst.Adolfo Lutz, 2008.
21. **Priority PAHs. Scientific, Campro.**
22. **Harbison, R.** *Polyaromatic Hydrocarbons*. St. Louis: Mosby : Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology 5ª edição, 1998.
23. **RG., Harvey.** *The Handbook of Environmental Chemistry of PAH's and Related Compounds*. London : Springer, 1998.

24. ISO 15753. Norma ISO. *Animal and vegetable fats and oils - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Suíça : s.n., 2006.
25. **Neto, Anibal D., et al., et al.** AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO HUMANA POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) E SEUS DERIVADOS NITRADOS (NHPAS):UMA REVISÃO MEDOTOLÓGICA. 2000, Vol. 6.
26. **MONOGRAPHS, IARC.** *Some Non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures*. Lyon : s.n., 2010. ISBN 978 92 832 1292 8 .
27. *Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation.* **Ravindra, Khaiwal., Sokhi, Ranjeet. e Grieken, René Van.** Atmospheric Environment, Bélgica : Elsevier, 2008.
28. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods.* **Moret, Sabrina e s.Conte, Lanfranco S.** Itália : Elsevier, 2000.
29. **Pinho, Olívia e Ferreira, Isabel.** Contaminantes Alimentares resultantes do Processamento Térmico. 2008, Vol. 5.
30. **Preedy, Victor R e Watson, Ronald Ross.** *Olives and Olive Oil in Health and Disease* . Oxford : Elsevier, 2010. ISBN: 978-0-12-374420-3 .
31. **Moffat CF, Whittle KJ.** *Polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum and other hydrocarbon contaminants*. s.l. : Sheffield Academic Press, 1999.
32. **Jardim, Isabel.** *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e novas Estratégias para a Preparação de Fases Sólidas*. Campinas : Scientia Chromatographica, 2010. Vol. 2. ISSN 1984-4433.
33. **A.Wise, Stephen.** Recent Progress in the Determination of PAH by High Performance Liquid Chromatography. *Handbook Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. New York : s.n., 1983.
34. **Waters.** Waters. [Online] [Citação: 13 de Julho de 2015.] www.waters.com.
35. —. *Acquity UPLC H-Class System Guide*. USA : s.n., 2010.
36. **Michael, E.Swartz.** *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction*. s.l. : Separation Science Refined, 2005.
37. **Relacre.** *Guia Relacre13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química* . s.l. : Relacre, 2000. ISBN: 972-8574-02-9.
38. **Acreditação, Coordenação Geral de.** *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. s.l. : Dicla, 2011.
39. Anexo 7 - Teste das Áreas Normalizadas. [Online] [Citação: 8 de Setembro de 2015.] http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/24/20024_24_Anexos_7_ANormaliz.pdf.
40. Anexo 8 - Análise de Resíduos. [Online] [Citação: 8 de Setembro de 2015.] http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/25/20025_25_Anexos_8_Resid.pdf.
41. Anexo 9 - Teste de RIKILT. [Online] [Citação: 8 de Setembro de 2015.] http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/26/20026_26_Anexos_9_RIKILT.pdf.
42. *Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas.* **Cassiano, Neila M. e Barreiro, Juliana Cristina.** São Carlos - Brasil : Química Nova, 2009, Vol. 32.
43. **Guide, Eurchem.** *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. 2014. ISBN 978-91-87461-59-0.
44. *Validação em Métodos Cromatográficos e electroforéticos.* **Ribani, Marcelo, Melo, Lúcio e Bottoli, Carla.** Campinas : Química Nova, 2004, Vol. 27.
45. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.** *ORIENTAÇÕES SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS*. 2003. DOQ-CGCRE-008.
46. **Van Trijp J, AH.R.** *Model for the calculation of calibration curves*. Netherlands : s.n., 1991.
47. **Acreditação, Instituto Português de.** *Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos*. 2005. OGC002.
48. **Penteado, J.Carlos, Magalhães, Dulce e Masini, Jorge.** *Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental*. Brasil : Química Nova, 2008.
49. **Thompson, Michael, Ellison, Stephen L.R. e Wood, Roger.** *HARMONISED GUIDELINES FOR THE USE OF RECOVERY INFORMATION IN ANALYTICAL MEASUREMENT*. USA : Pure & Appl. Chem, 1999 IUPAC.

8 . Anexos

Anexo A –Estudos das condições operacionais do método

- Solução de 4 PAHs de 100 ppb com PI (B[b]C)⁴
- Temperatura da coluna = 25°C
- λ_{exc} = 252 nm
- λ_{emis} = 406 nm

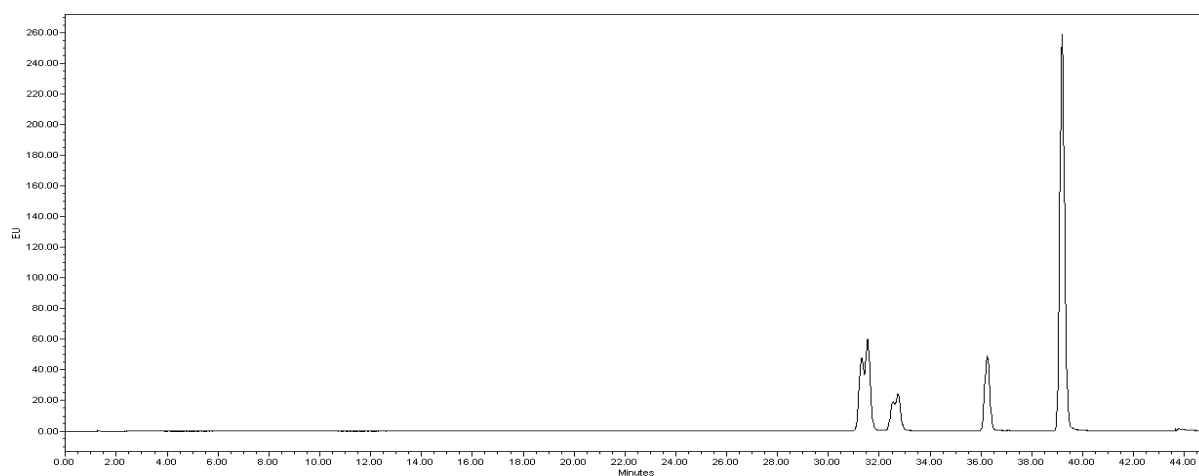


Figura 8.1 Cromatograma 4 PAHs - Gradiente da Norma ISO 15753:2006

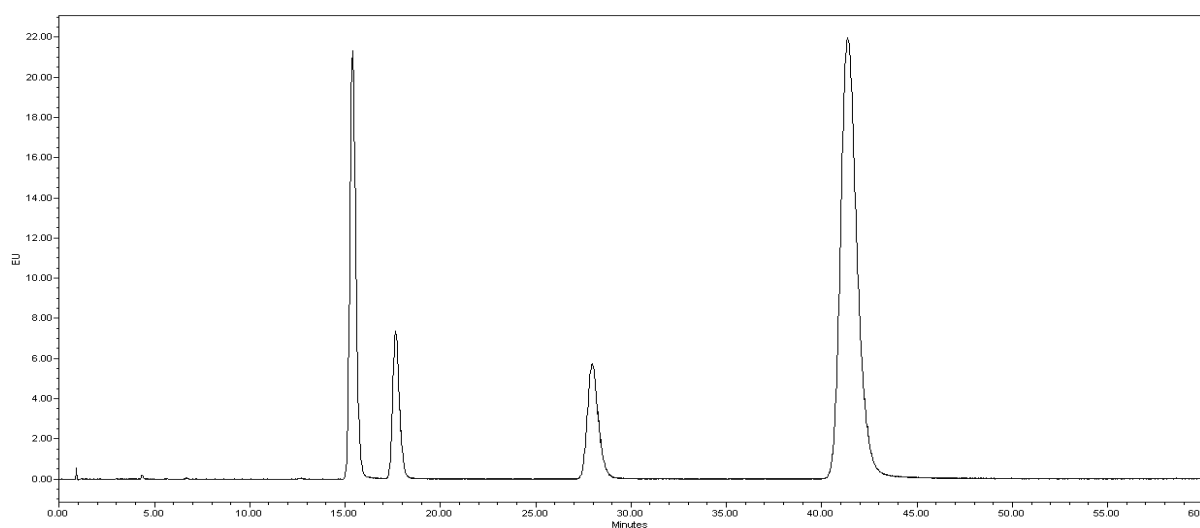


Figura 8.2 Cromatograma 4 PAHs - Gradiente Isocrático Acetonitrilo:Água (75:25)

⁴Devido a falta dos oito padrões, procedeu-se apenas ao estudo das condições operacionais numa fase inicial com uma solução de 4 PAH's mais padrão interno, no qual foi fornecido pela Sovena Oilseeds.

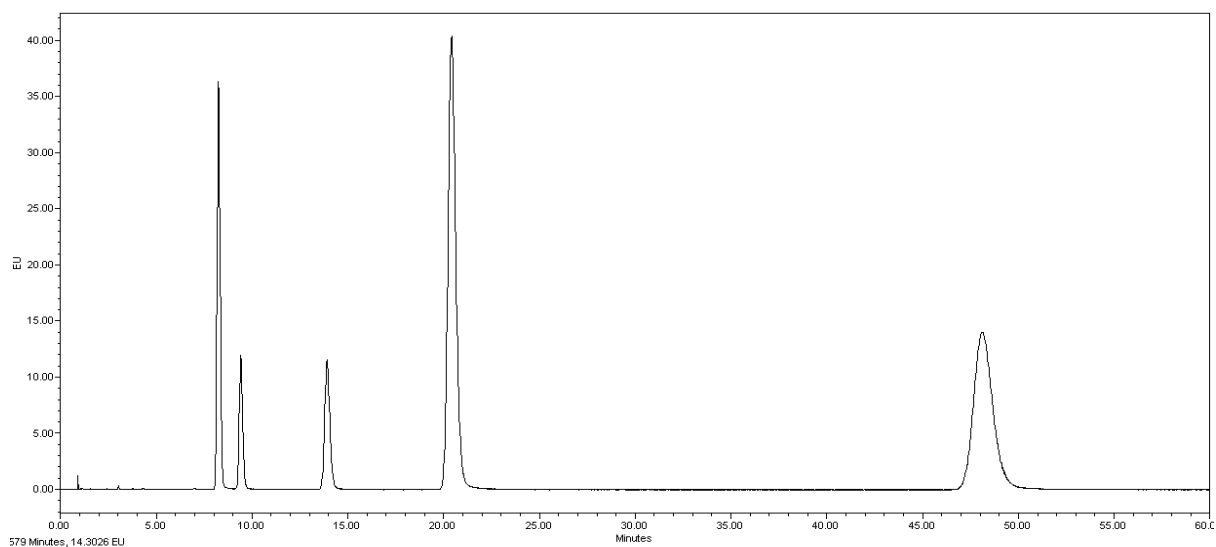


Figura 8.3 Cromatograma 4 PAHs - Gradiente Isocrático Acetonitrilo:Água (85:15)

- Solução de 8 PAHs de 100 ppb com PI⁵
- Temperatura da coluna = 25°C
- $\lambda_{exc} = 252 \text{ nm}$
- $\lambda_{emis} = 406 \text{ nm}$

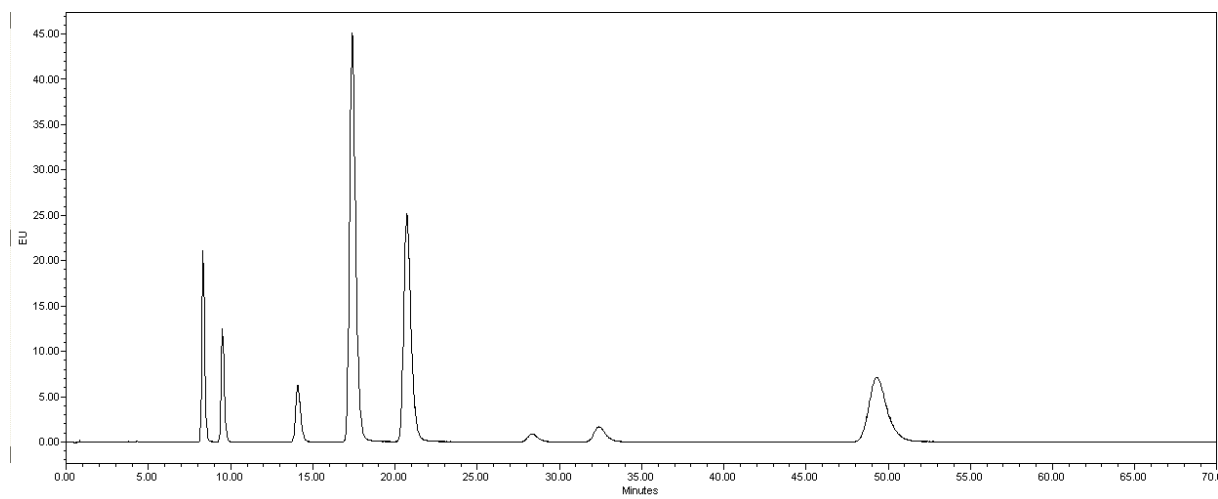


Figura 8.4 Cromatograma de 8 PAHs - Gradiente Isocrático Acetonitrilo:Água (85:15)

Pela figura 8.4, observar-se a falta do indeno [1,2,3-cd] pireno pelo que a escolha do comprimento de onda de excitação e emissão não é melhor opção para o método em estudo. Assim sendo, procedeu-

⁵Devido a falta dos oito padrões, procedeu-se apenas ao estudo das condições operacionais numa fase inicial com uma solução de 4 PAHs mais padrão interno, no qual foi fornecido pela Sovena Oilseeds.

se aos estudos de diferentes canais de detecção nomeadamente o descrito na Norma ISO 15753:2006, como ilustrado nas figuras 8.5 a 8.8.

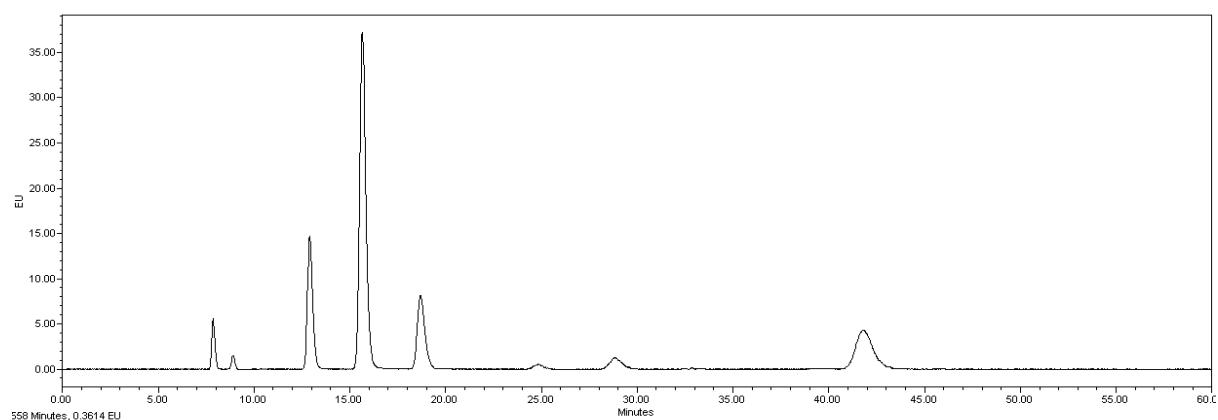


Figura 8.5 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo:Água (85:15) - Canal A

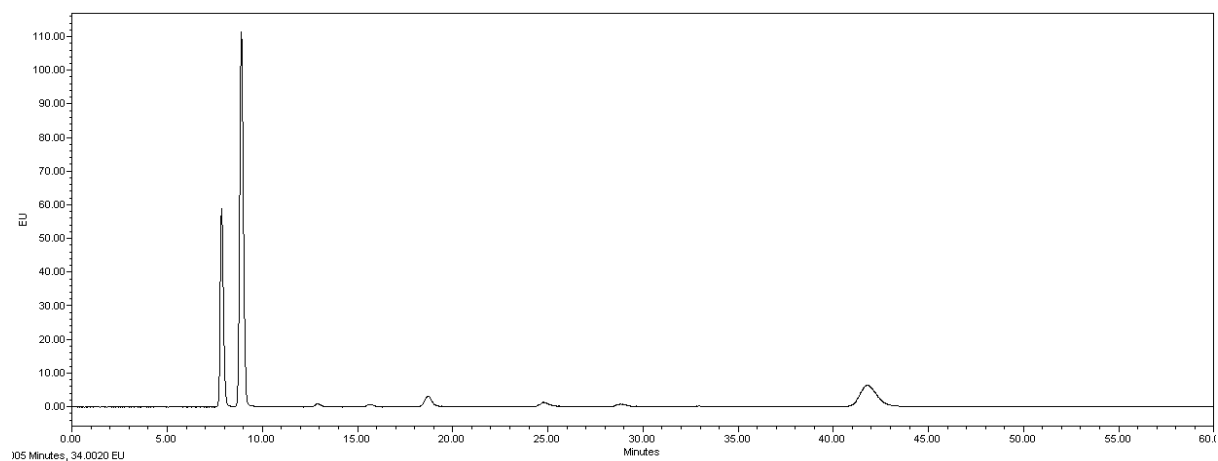


Figura 8.6 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo: Água (85:15) - Canal B

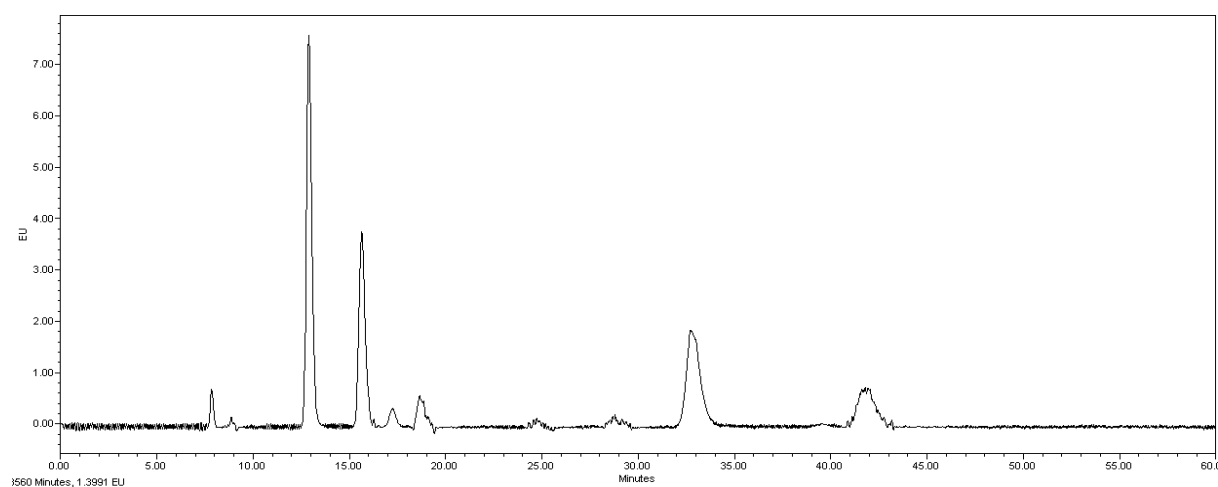


Figura 8.7 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo:Água (85:15) - Canal C

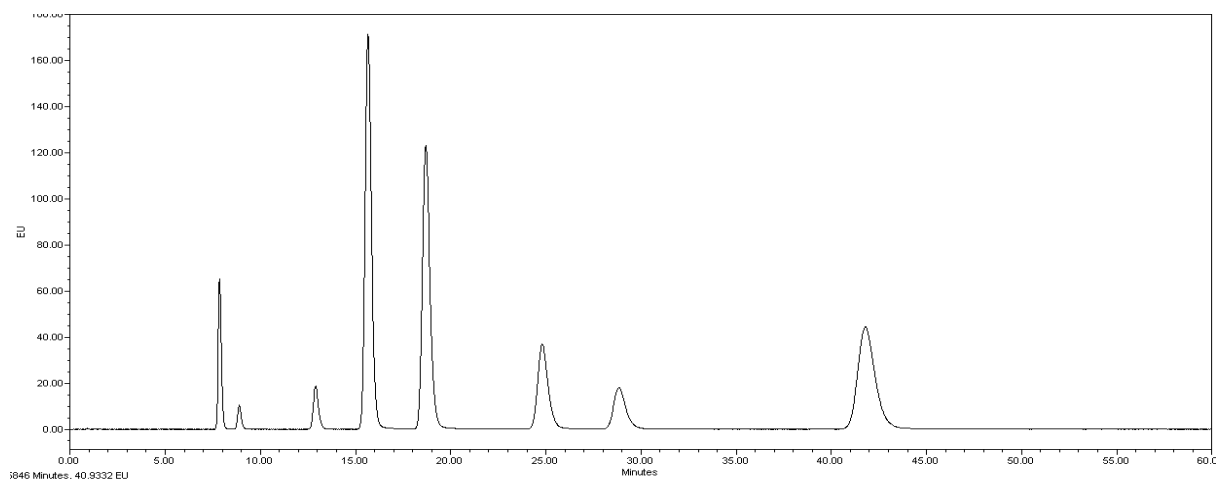


Figura 8.8 Cromatograma 8 PAHs - Gradiente Acetonitrilo:Água (85:15) - Canal D

Contudo, procedeu-se a variação de gradiente (tabela 3.2) tendo-se obtido picos com melhor resolução cromatográfica (picos gaussianos ideais), como ilustrado nas figuras 8.9 a 8.12.

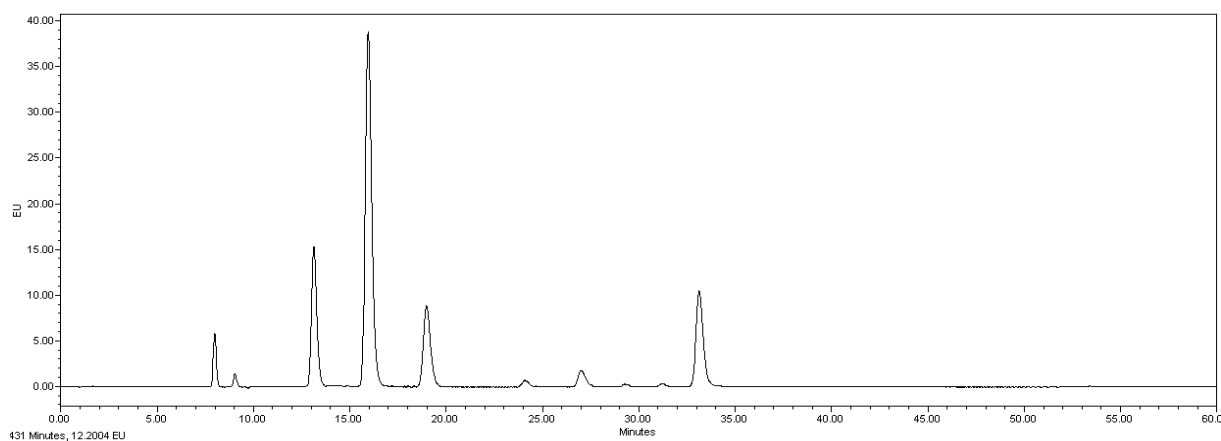


Figura 8.9 Cromatograma 8 PAHs - Variação de gradiente - Canal A

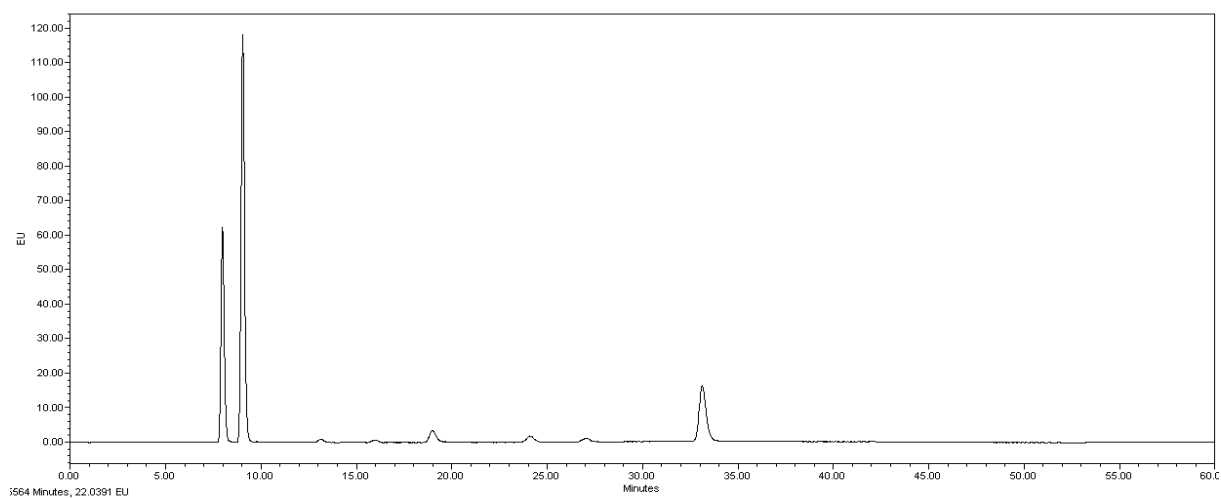


Figura 8.10 Cromatograma 8 PAHs - Variação de Gradiente - Canal B

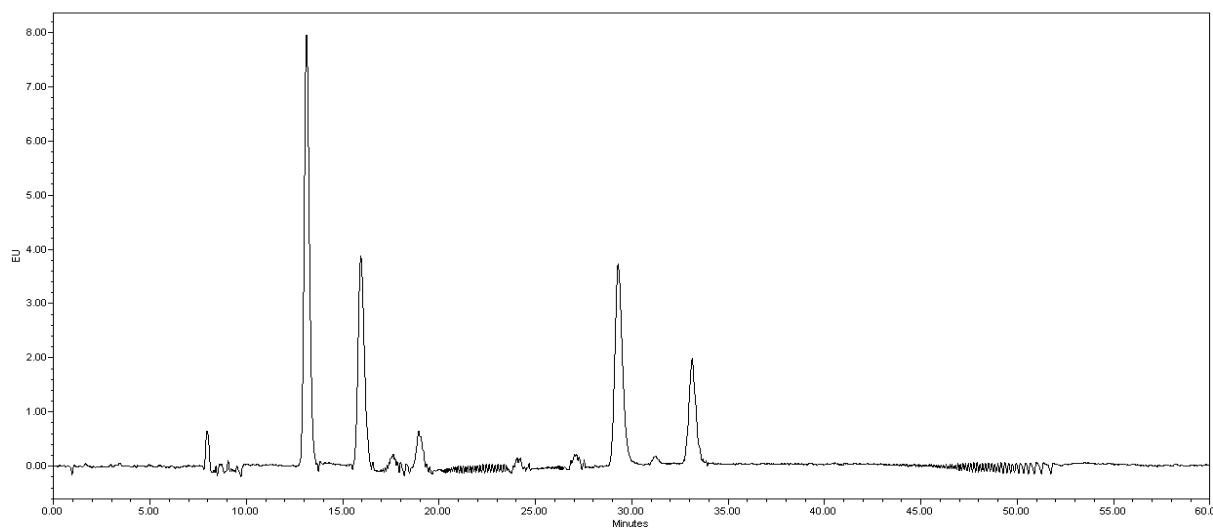


Figura 8.11 Cromatograma 8 PAHs - Variação de Gradiente - Canal C

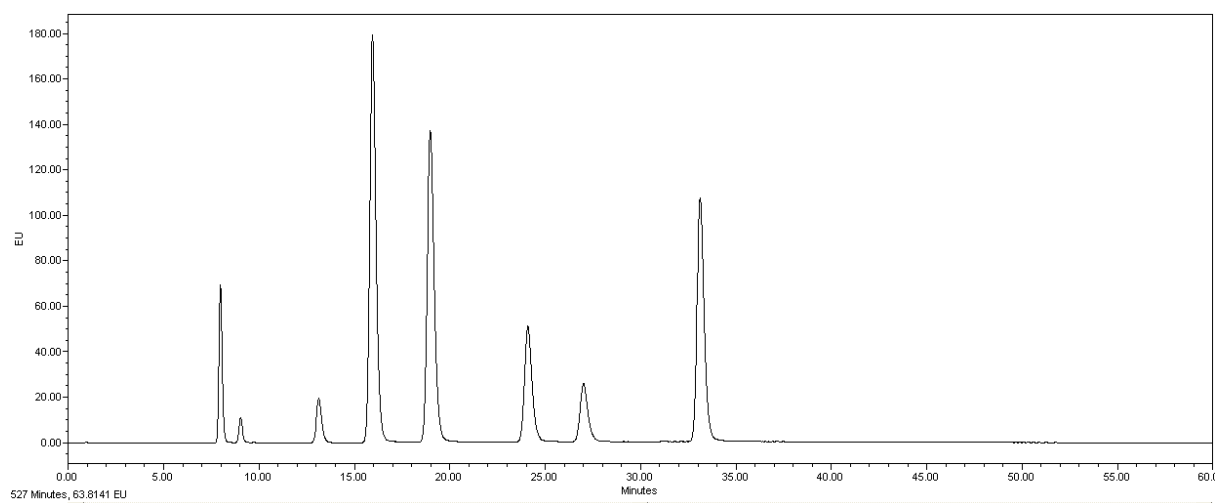


Figura 8.12 Cromatograma 8 PAHs - Variação de Gradiente - Canal D

Anexo B –Estudo da Linearidade do padrão interno

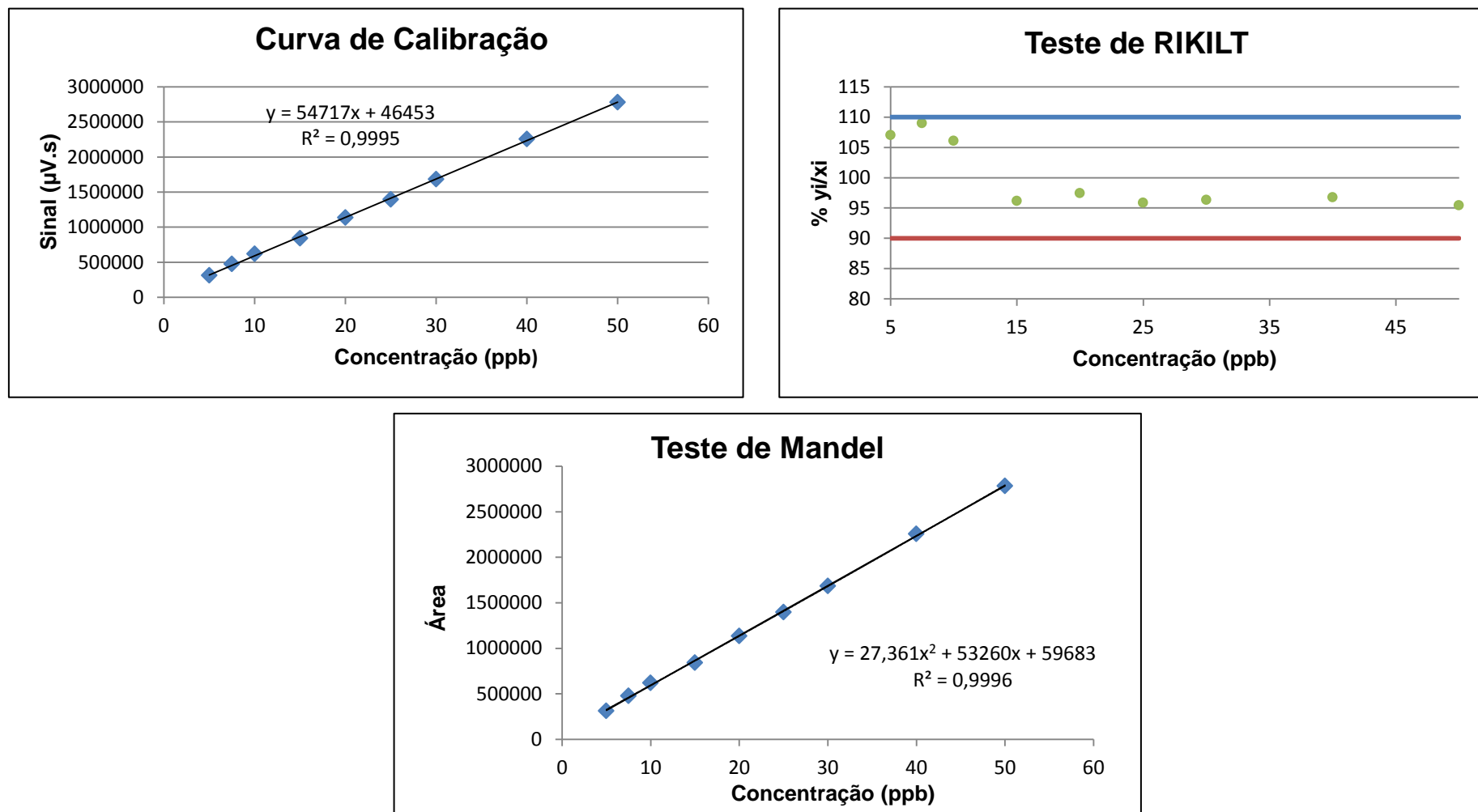


Figura 8.13 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do padrão interno - Canal A

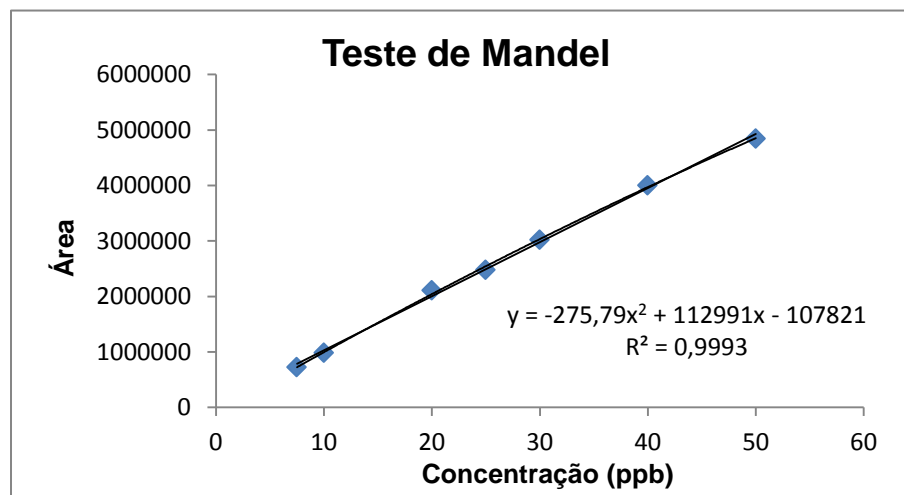
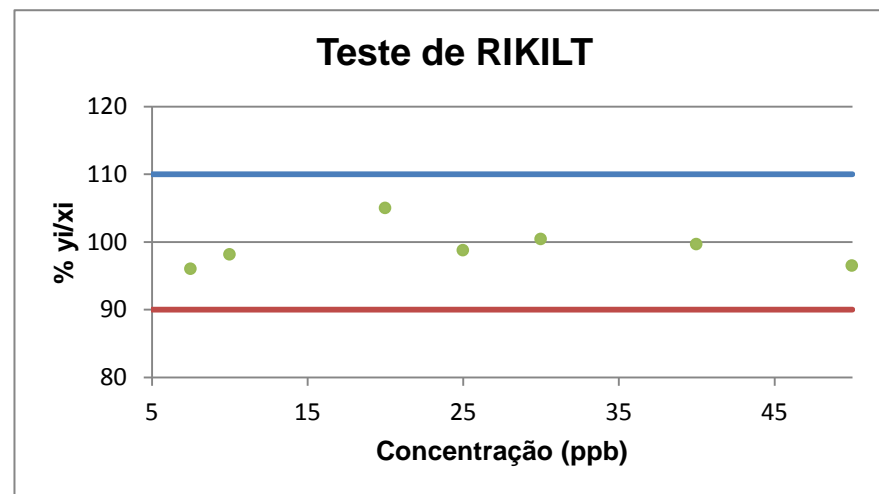
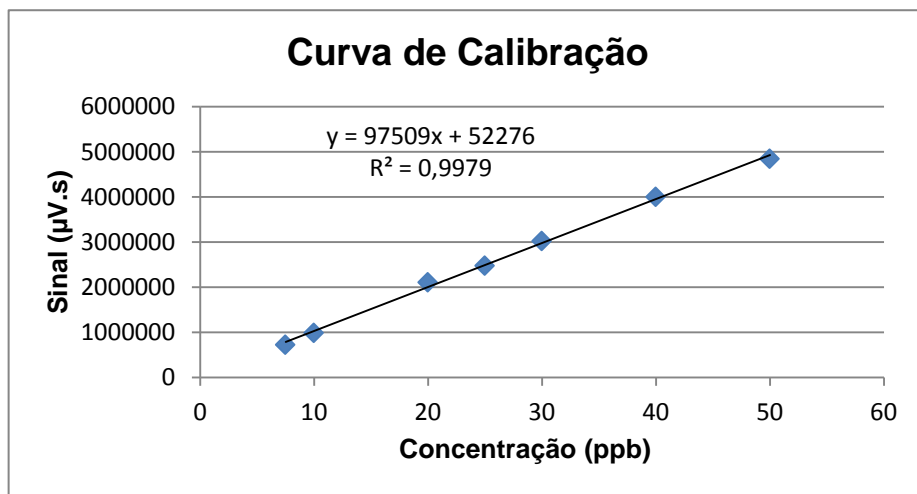


Figura 8.14 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do padrão interno - Canal B

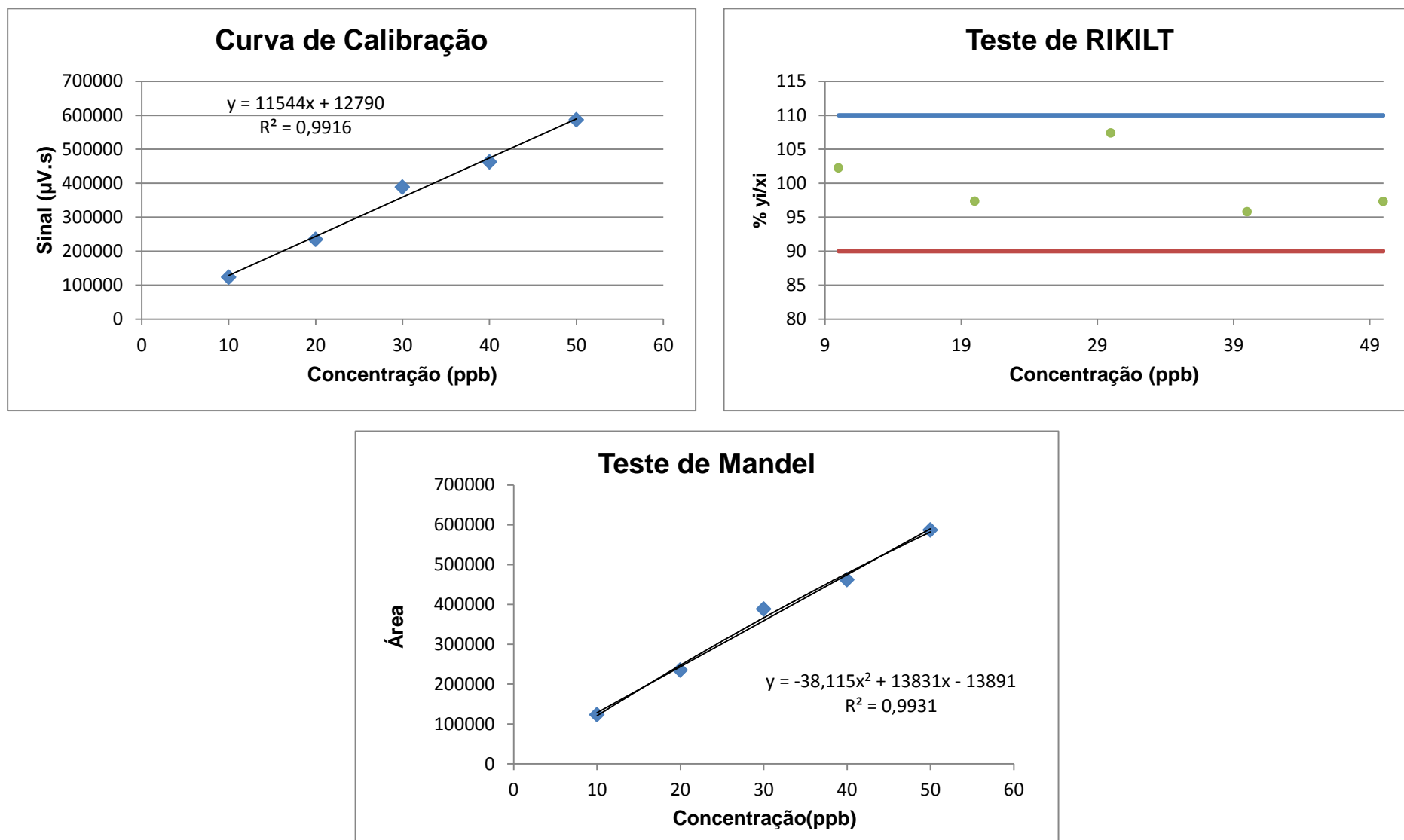


Figura 8.15 Testes Estatísticos para estudo da linearidade do padrão interno- Canal C

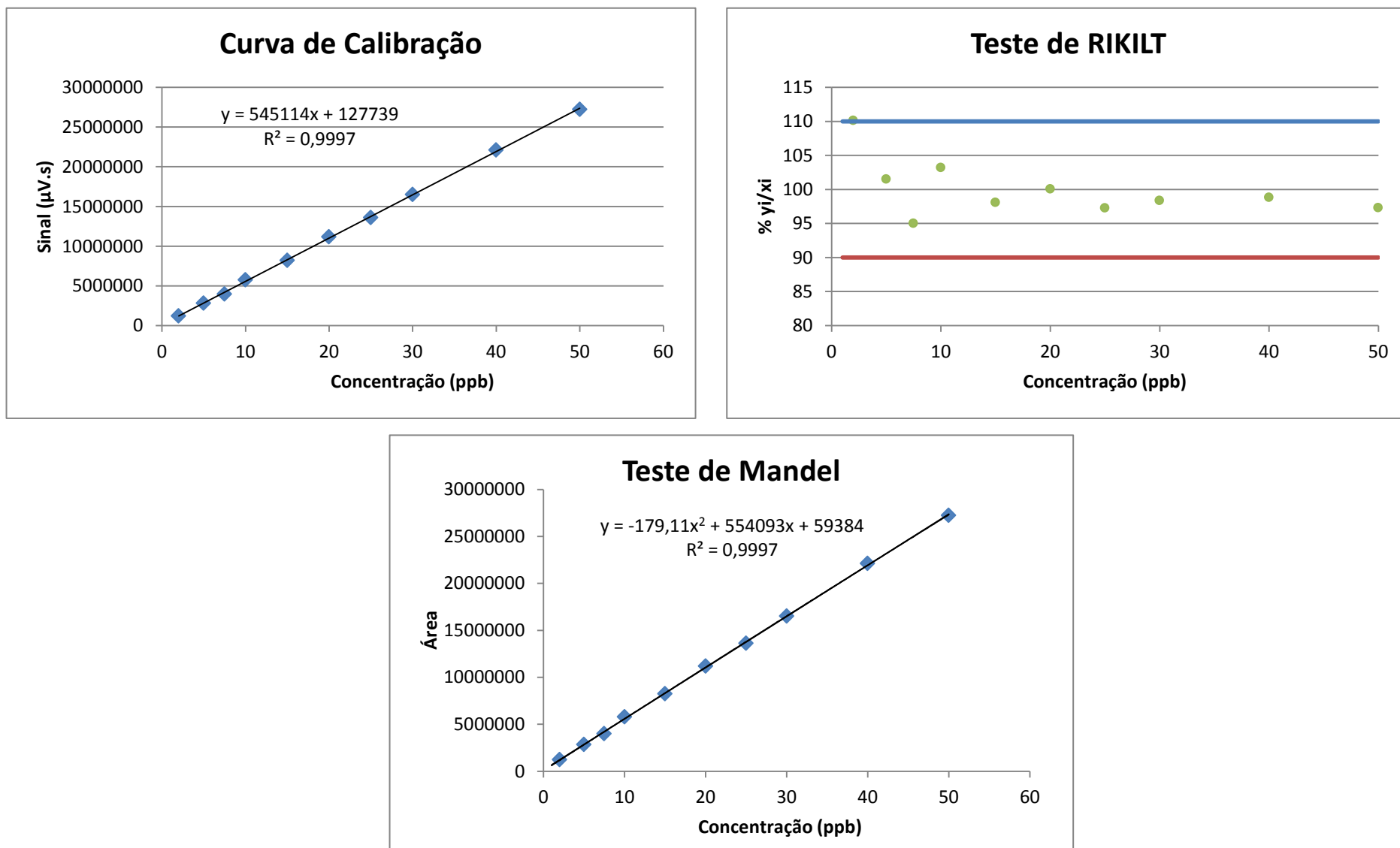


Figura 8.16 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do padrão interno - Canal D

Anexo C – Estudo da Linearidade dos 8 PAHs

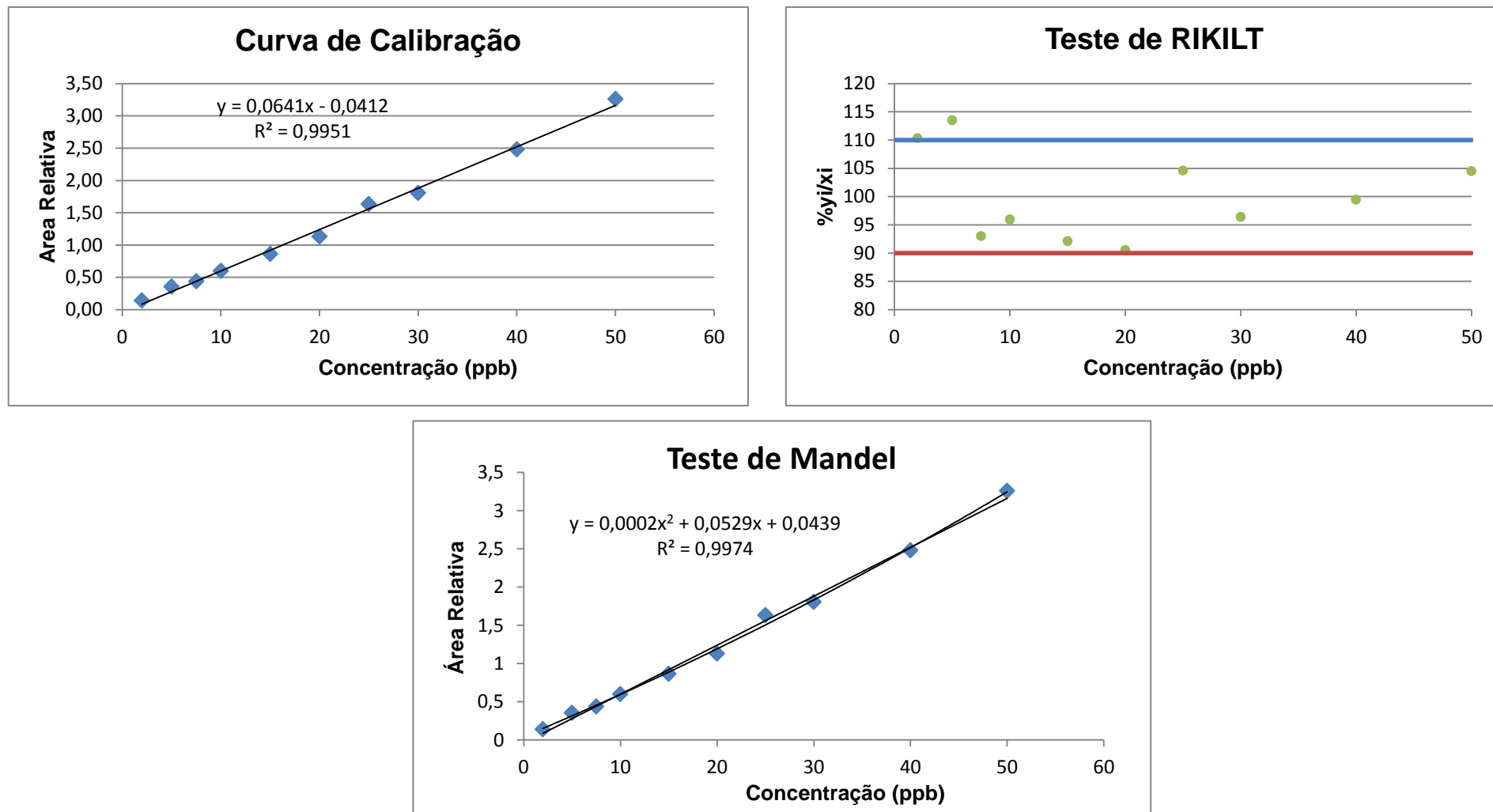


Figura 8.17 Testes Estatísticos para o estudo de linearidade do Benzo [a] Antraceno

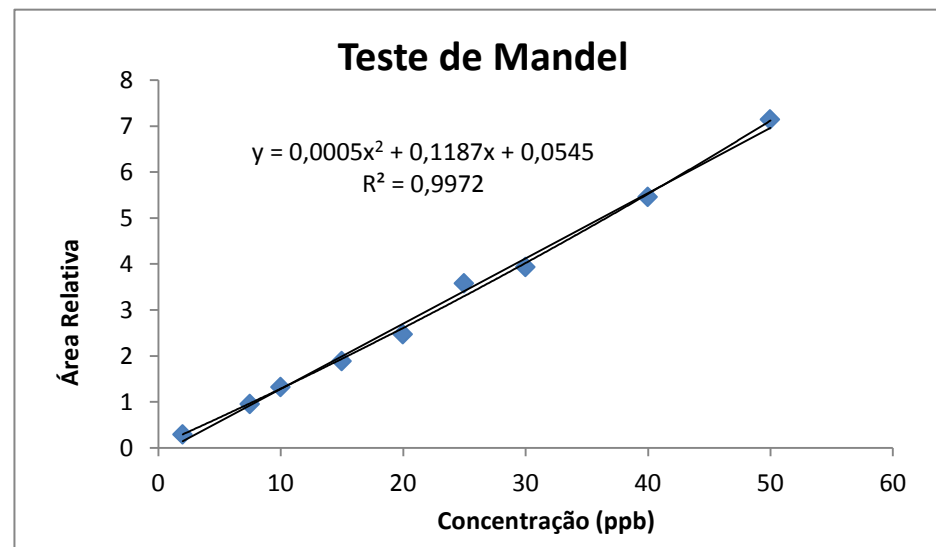
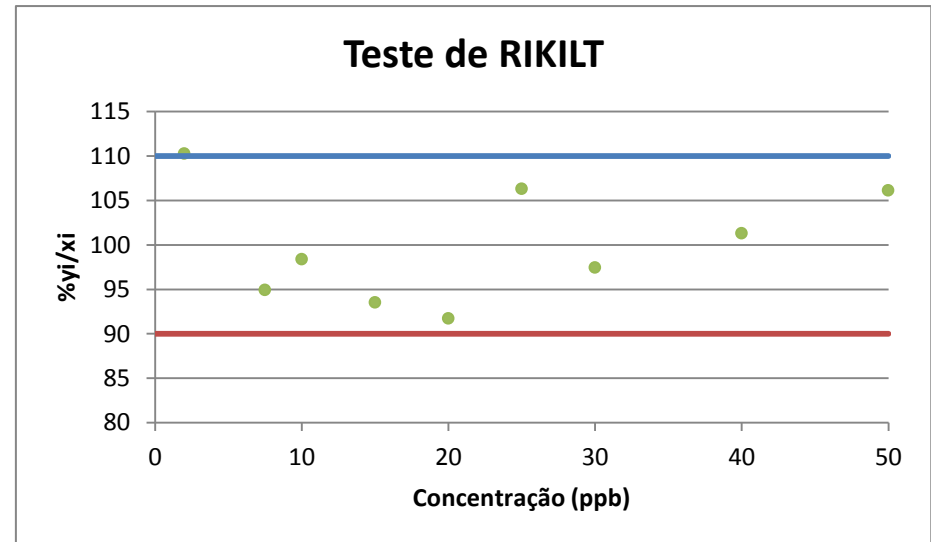
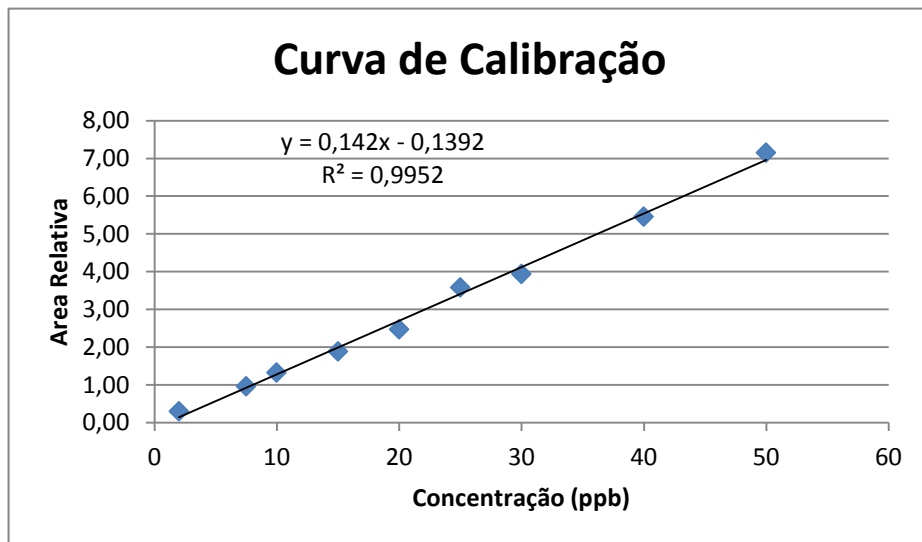


Figura 8.18 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Criseno

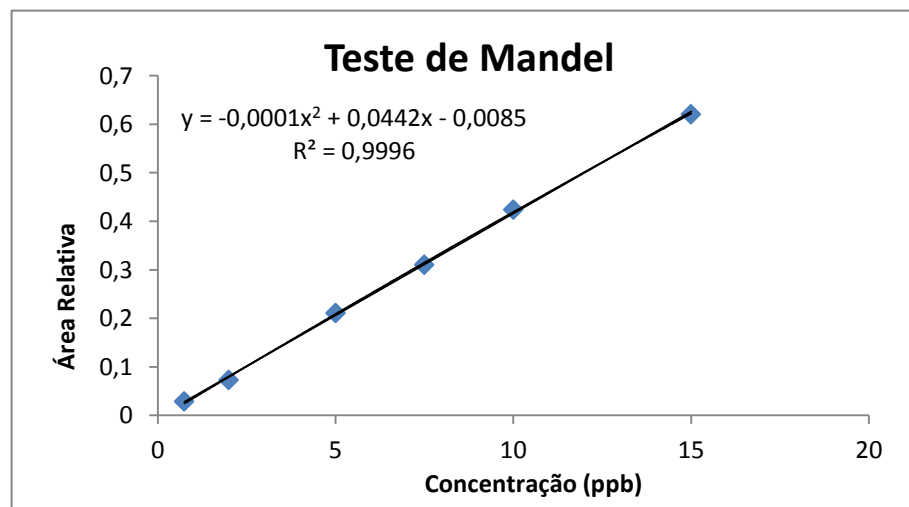
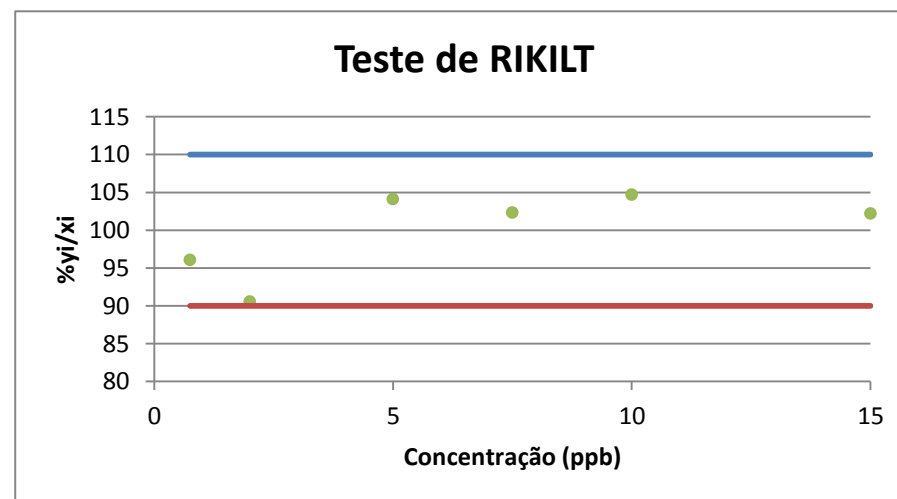
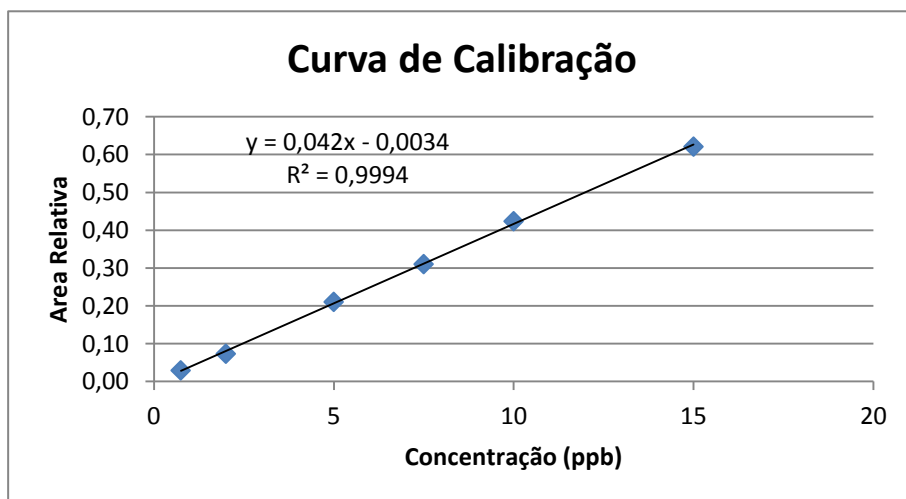


Figura 8.19 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[b]Fluoranteno

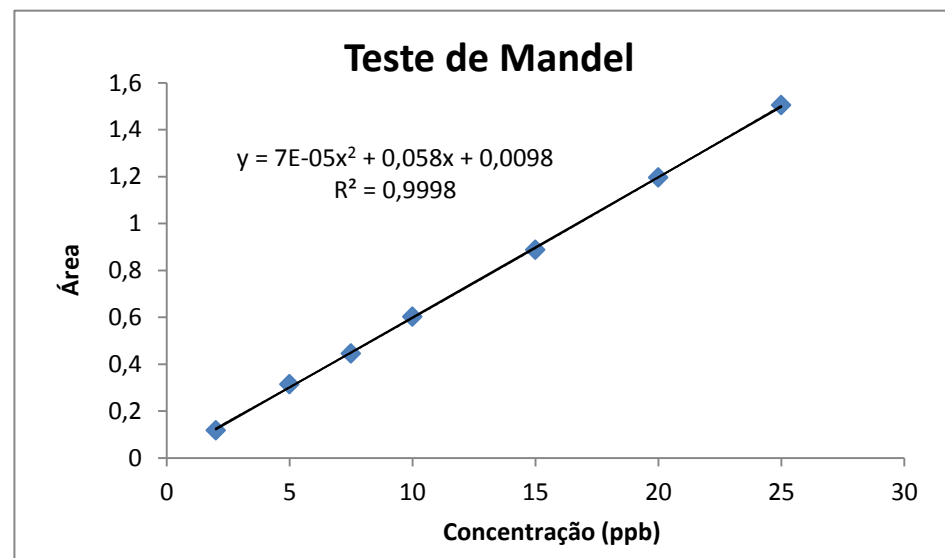
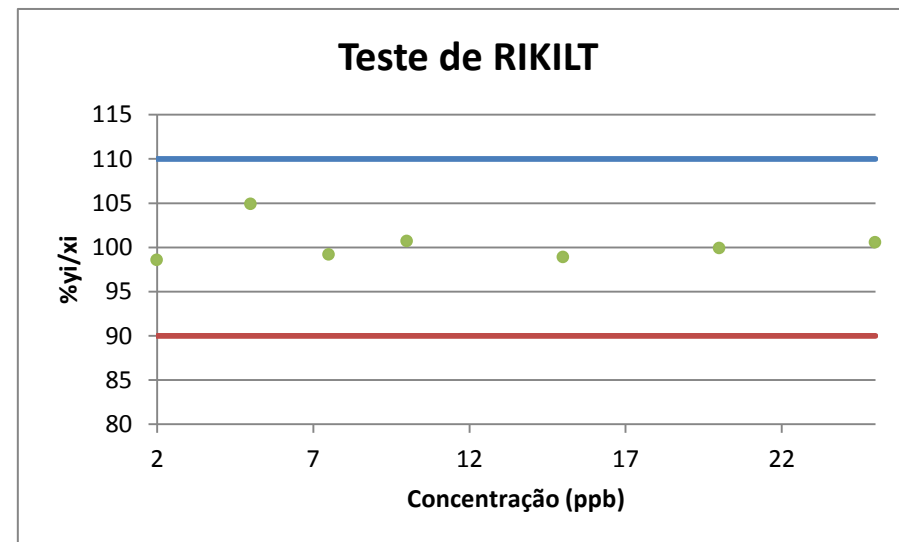
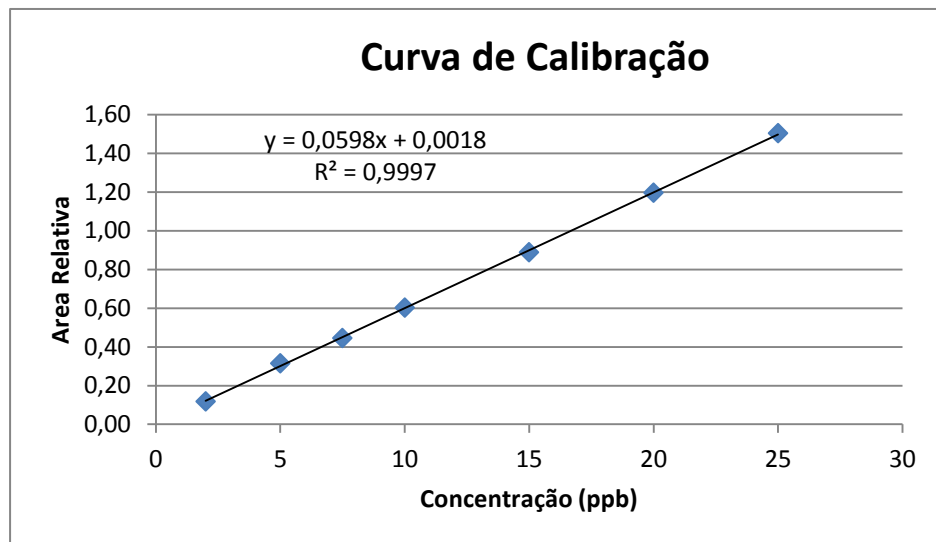


Figura 8.20 Teste Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[k]Fluoranteno

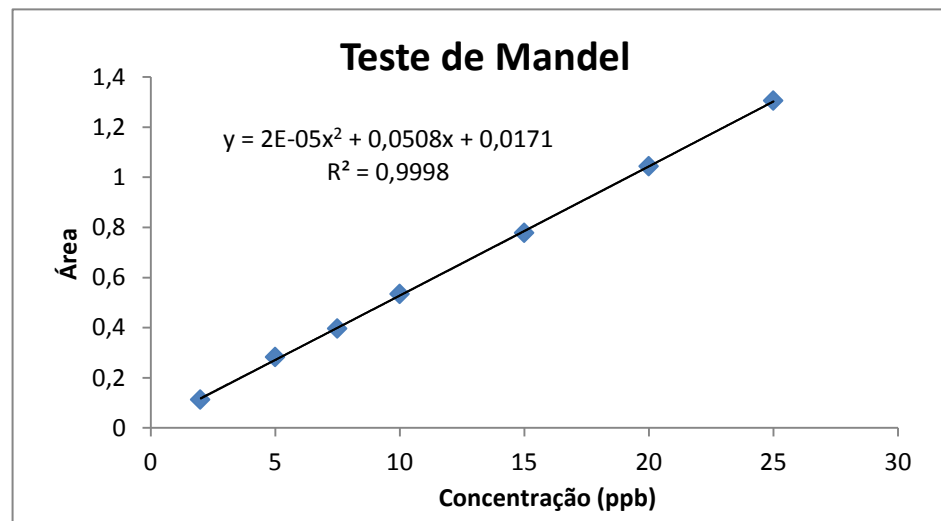
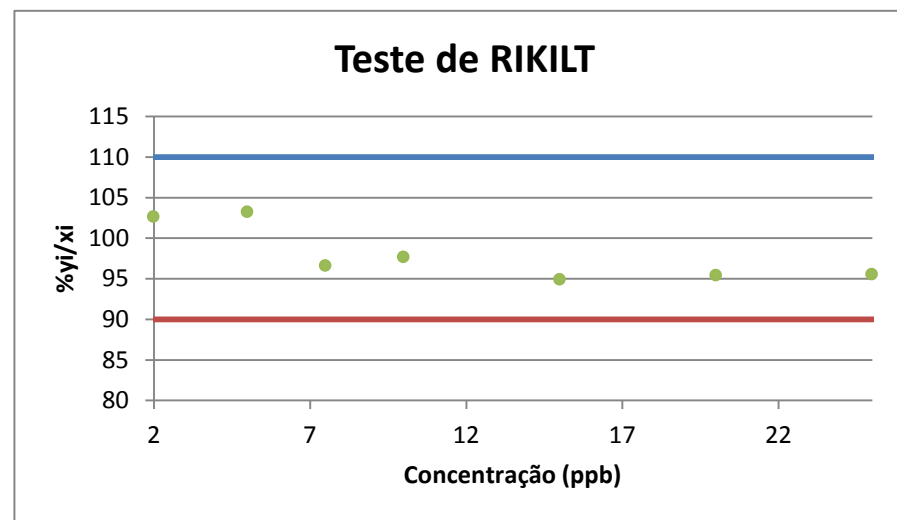
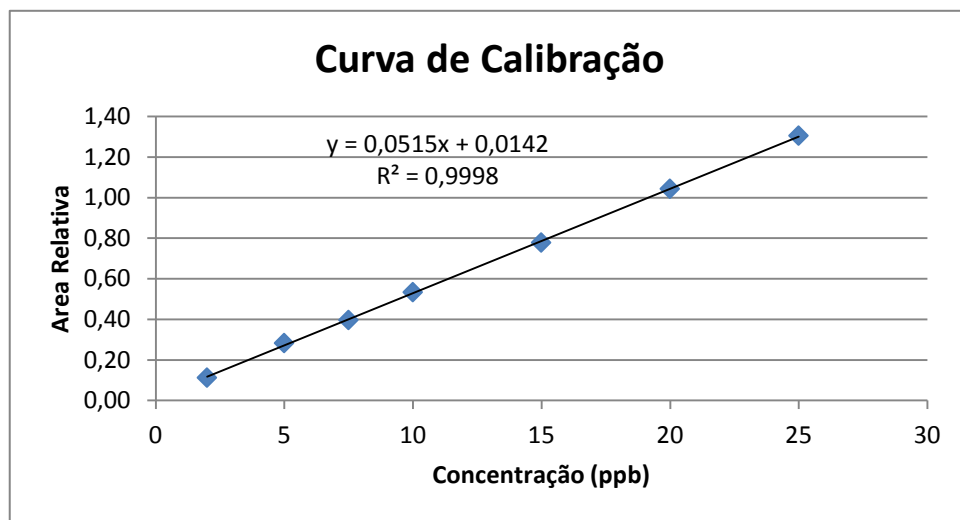


Figura 8.21 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[a]Pireno

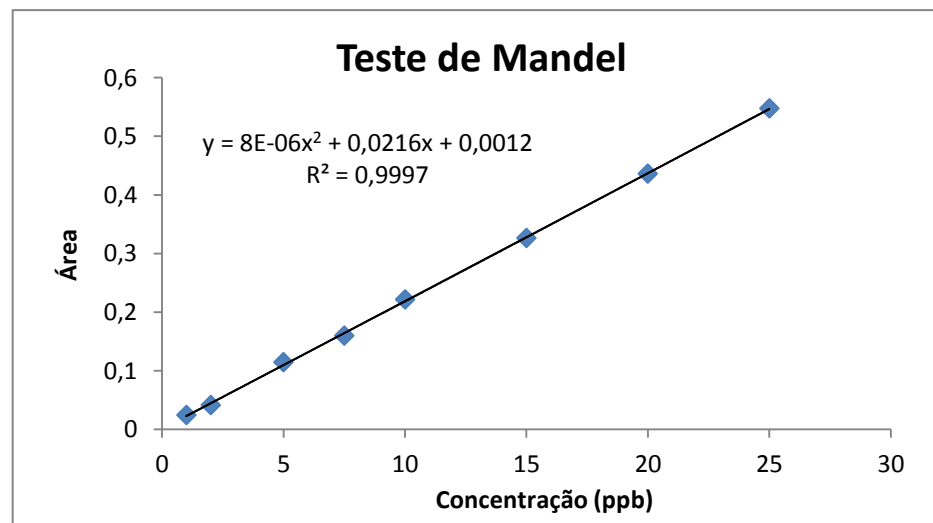
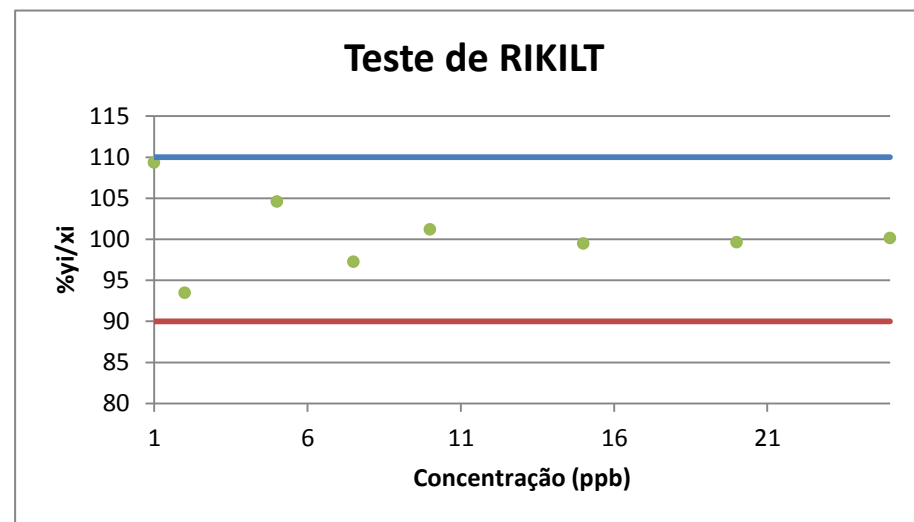
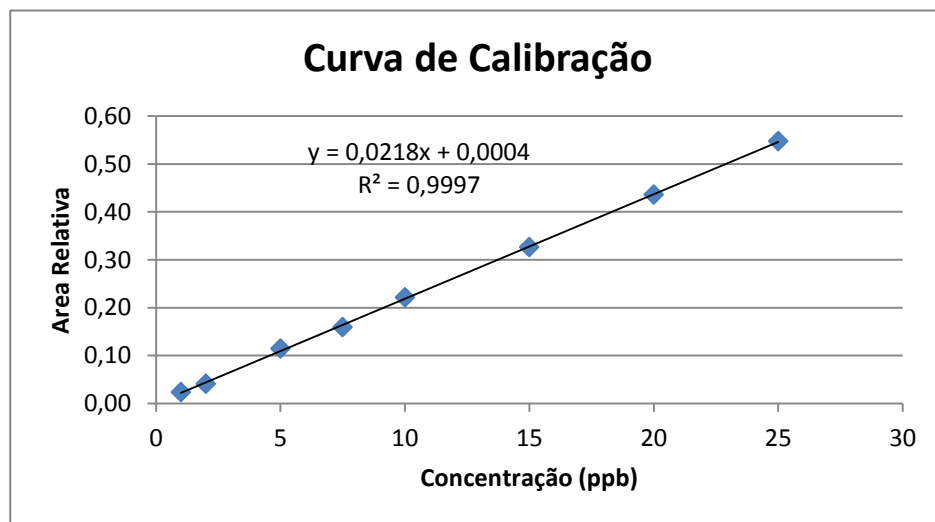


Figura 8.22 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Dibenzo[a,h]Antraceno

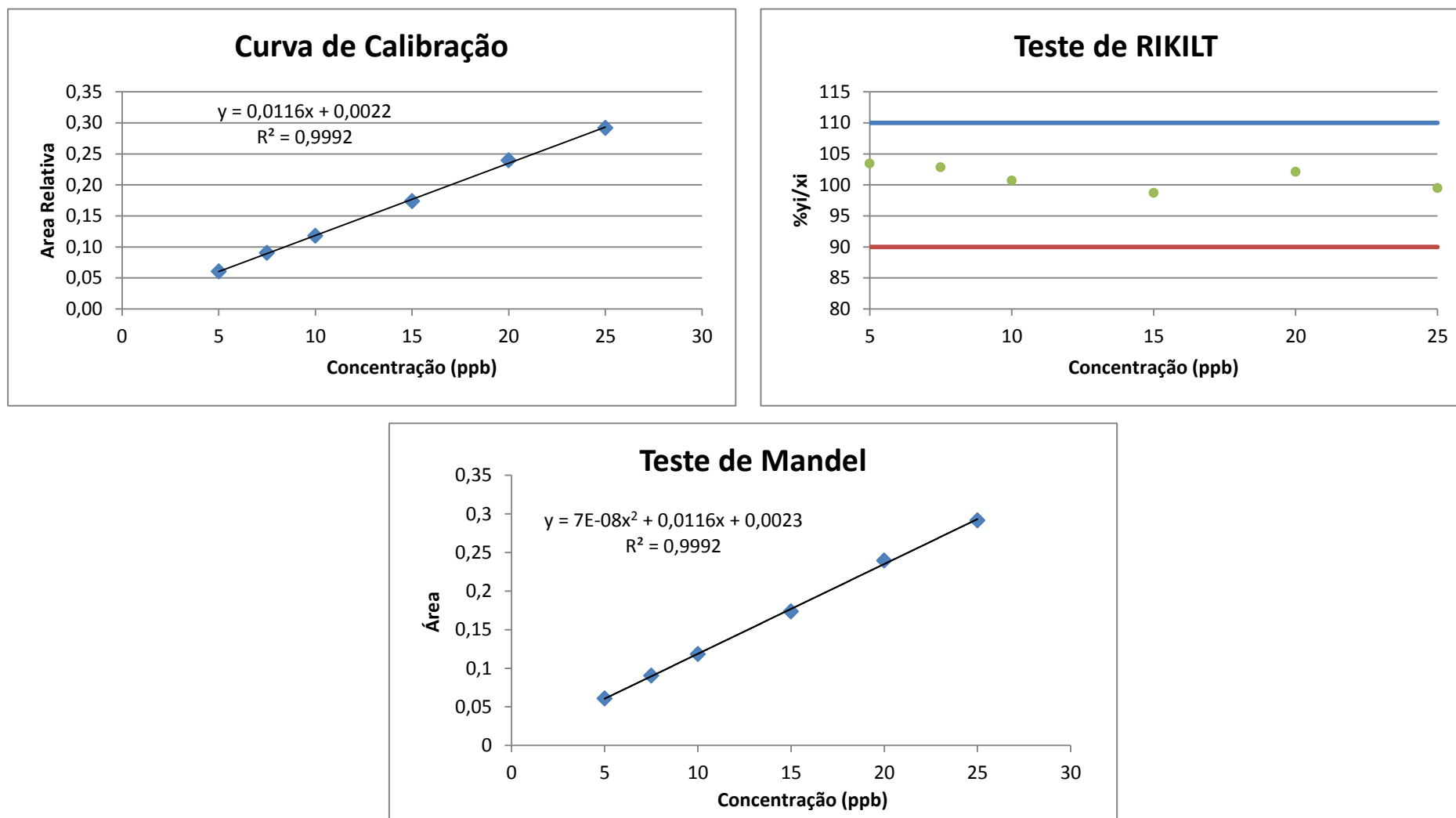


Figura 8.23 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Benzo[g,h,i]Perileno

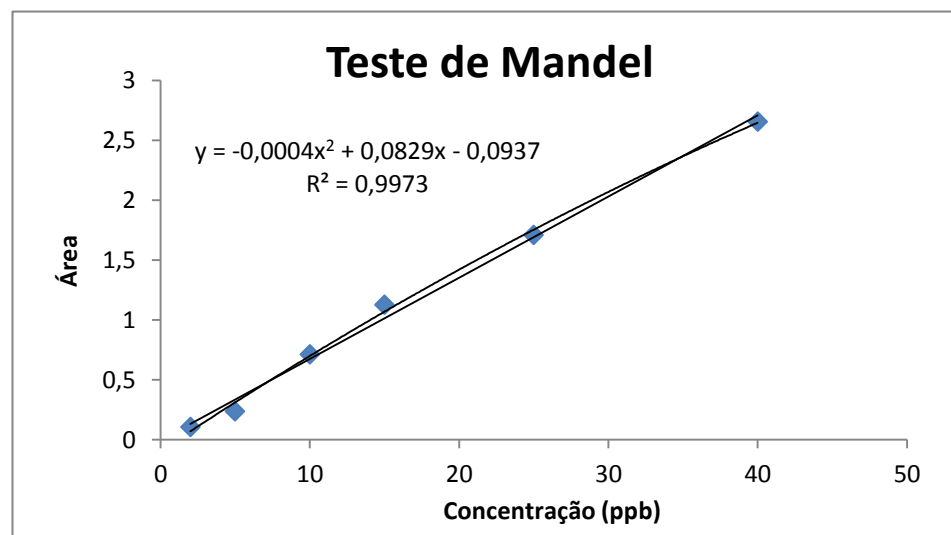
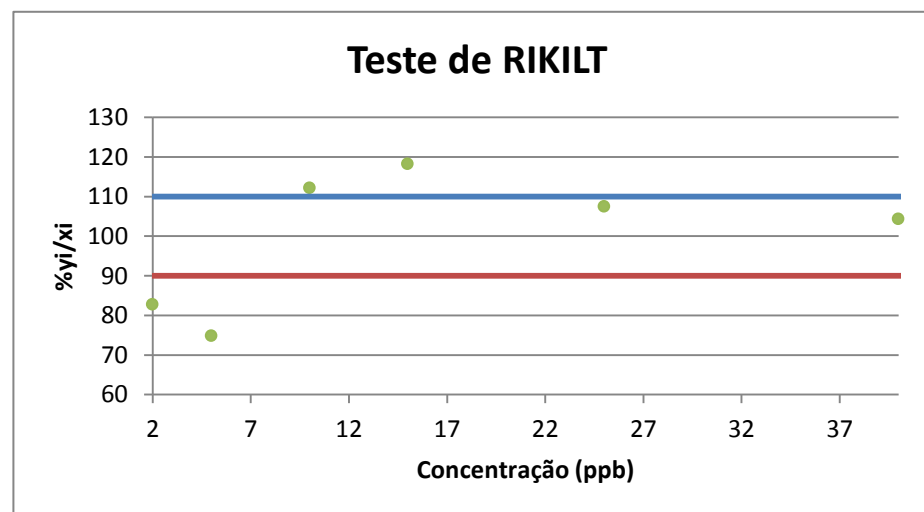
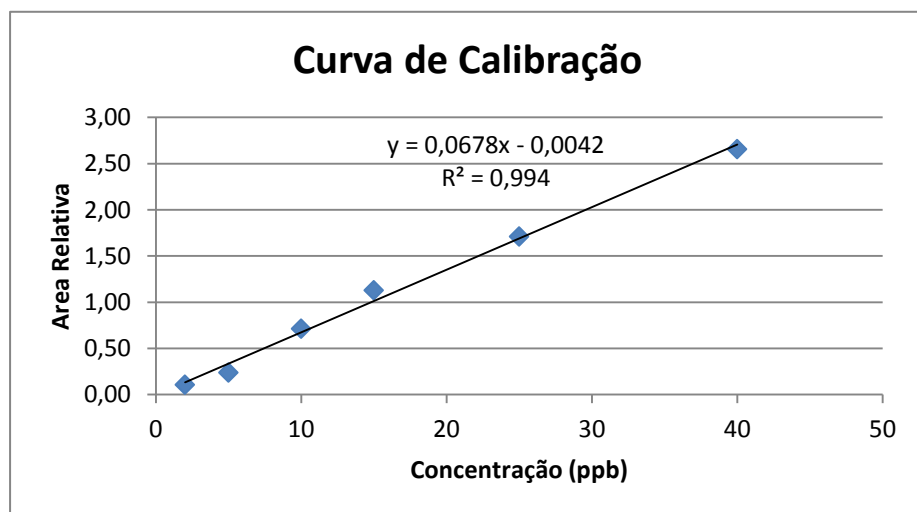


Figura 8.24 Testes Estatísticos para o estudo da linearidade do Indeno[1,2,3-cd]Pireno

Anexo D – Estudo da Linearidade do injetor

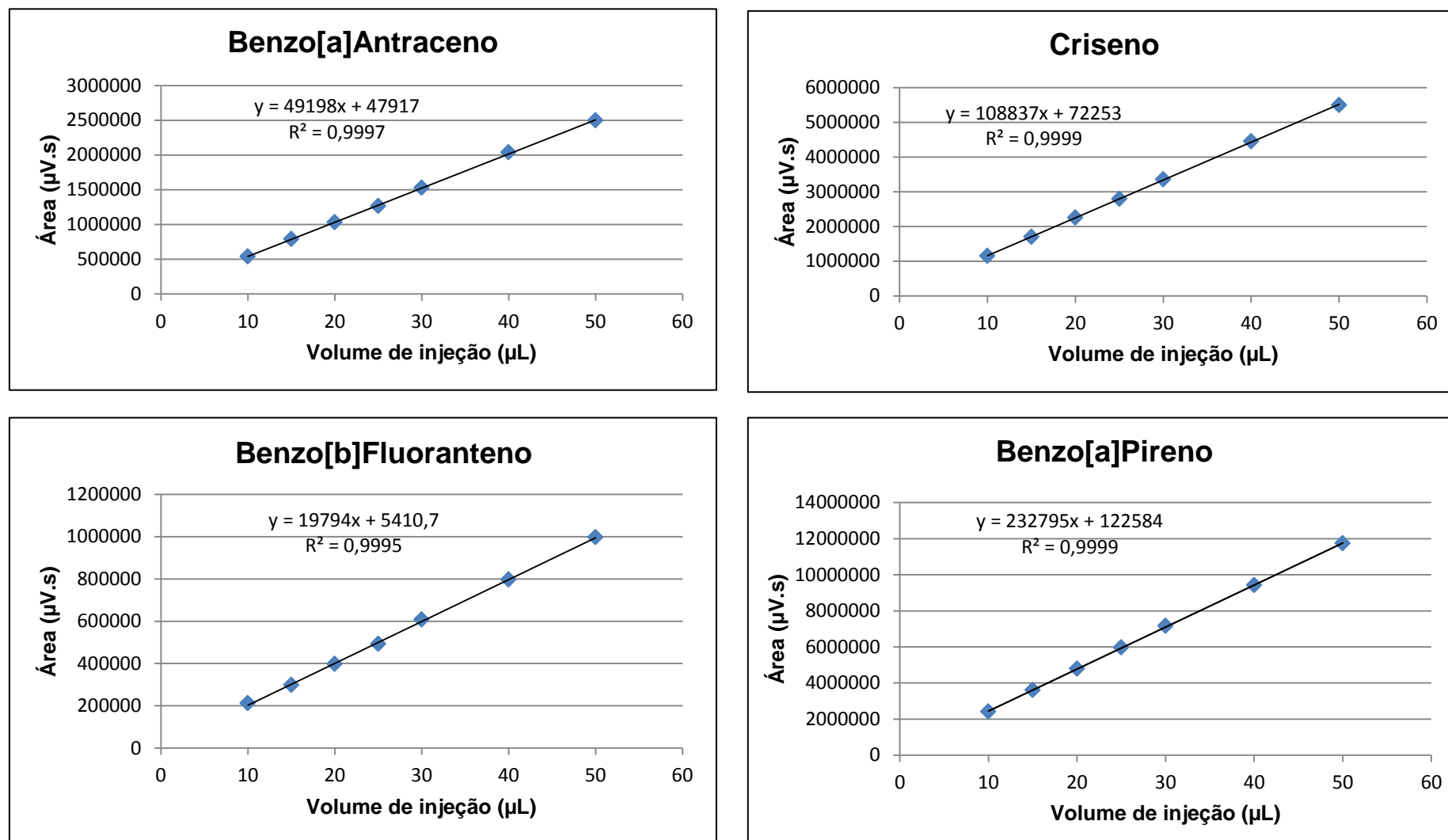


Figura 8.25 Linearidade do injetor - Representação gráfica dos valores da área do pico vs volume de injeção na solução de 8 PAHs a 20 ppb

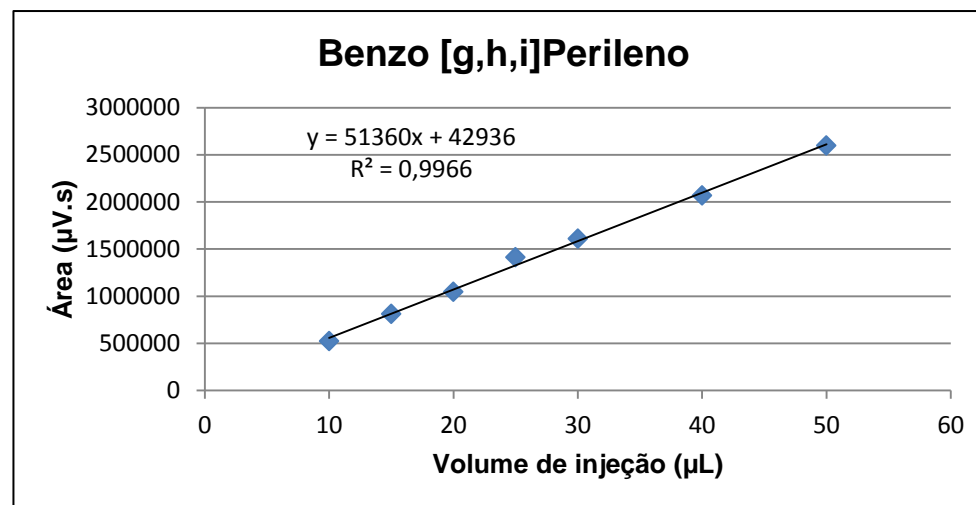
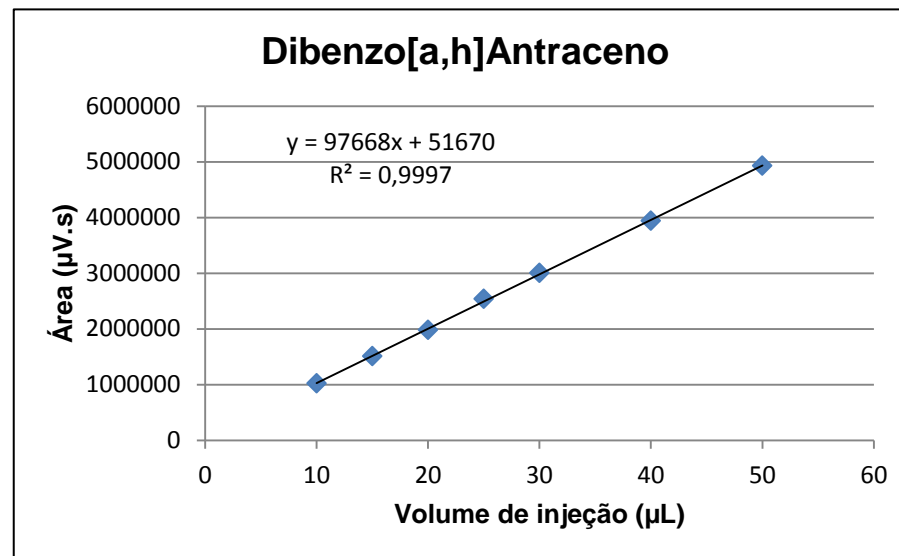
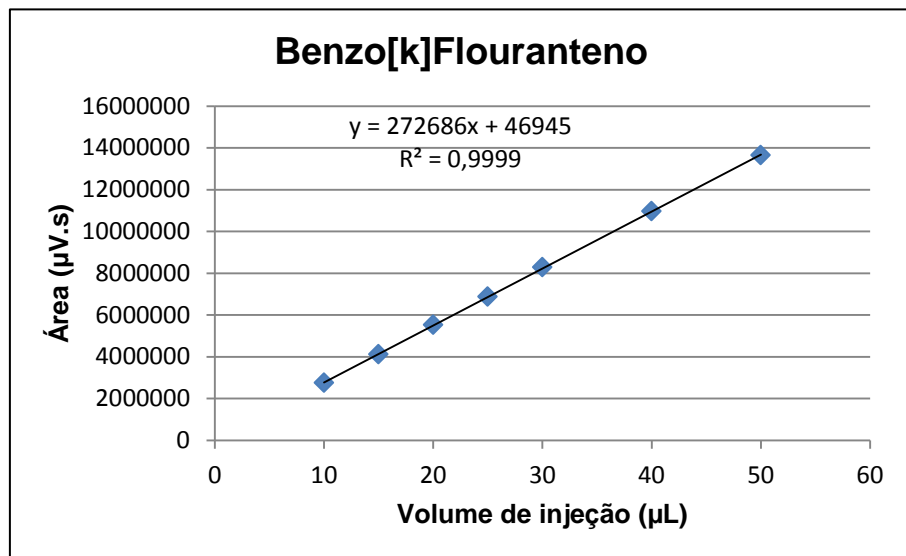


Figura 8.26 Linearidade do injetor - Representação gráfica dos valores da área do pico vs volume de injeção na solução de 8 PAHs a 20 ppb